Über den Einfluß der genetischen Konstitution auf den Gehalt von Zimt- und Phenolcarbonsäuren, Samenölen und Blattlipiden bei Oenotheren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Christine Burhenn
aus Heising/Kempten

1985

Über den Einfluß der genetischen Konstitution auf den Gehalt von Zimt- und Phenolcarbonsäuren, Samenölen und Blattlipiden bei Oenotheren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Christine Burhenn
aus Heising/Kempten

1985

Tag der mündlichen Prüfung	19.12.1985
Dekan	Prof. Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle
2. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle für seine unterstützenden Ratschläge und seine freundliche Diskussionsbereitschaft während der Arbeit, - nicht zuletzt auch für die Bereitstellung des Saatgutes, eine wichtige Grundlage für diese Arbeit.

Frau U. Christner, Herrn S. Lelke und vor allem Frau S. Görig danke ich für die vielen kleinen Hilfeleistungen in Gewächshaus und Labor.

Besonders herzlich möchte ich auch Herrn G. Nicholson und Dr. J. Gerhardt (Institut für Organische Chemie, Tübingen) für ihre wertvolle Hilfe beim Umbau des Gaschromatographen und für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen danken.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

bert.	berteriana
BP	Basispeak
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl-)trifluoracetamid
Cer	Cerebrosid
CL	Cardiolipin
cp-DNA	Plastiden-DNA
DC	Dünnschichtchromatographie
DGDG	Digalactosyldiglycerid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ESG	Sterylglycosidester
EtOH	Ethanol
FA	Fettsäure
FAME	Fettsäuremethylester
FE	Flächeneinheiten
Fer.	Ferulasäure
Gall.	Gallussäure
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GL	Glykolipid
Kaf.	Kaffeesäure
KGC	Kapillargaschromatographie
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPG	Lysophosphatidylglycerin
LPS	Lysophosphatidylserin
M	Molekülionenpeak
m/e	Ionenmasse/Ionenenergie
MeOH	Methanol
MGDG	Monogalactosyldiglycerid
mt-DNA	mitochondriale DNA
mut.	Mutante
NL	Neutrale Lipide
od.	odorata
Oe.	Oenothera
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin

p-Cu.	p-Cumarsäure
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
Pl.	Plasmon
PL	Phospholipid
PS	Phosphatidylserin
RRF	Relativer Responsefaktor
SG	Sterylglycosid
SL	Sulfolipid
SQD	Sulfoquinovosyldiglycerid
TMS	Trimethylsilyl

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	5
B.1. Material und Methoden	5
B.1.1. Versuchspflanzen	5
B.1.2. Anzucht der Pflanzen	5
B.1.3. Extraktion der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	6
B.1.4. Aufarbeitung des Extrakts	6
B.1.5. Gaschromatographische Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	8
B.1.5.1. Trimethylsilylierung der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	8
B.1.5.2. Analysendaten zur KGC	9
B.1.5.3. Qualitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren über Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	11
B.1.5.4. Quantitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	11
B.1.5.5. Statistik	13
B.2. Ergebnisse	14
B.2.1. Qualitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren über GC/MS	14
B.2.2. Quantitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren	19
B.2.3. Akkumulation von gebundenen Zimt- und Phenolcarbonsäuren in Oenotherenblättern	19
B.3. Diskussion	24
B.3.1. Zur Methodik	24
B.3.2. Der Einfluß der Kerngenome und des Plasmons auf den Gehalt an Zimt- und Phenolcarbonsäuren in Oenotherenblättern	24
C. Analyse der Samenöle	26
C.1. Material und Methoden	26
C.1.1. Oenotherensamen	26
C.1.2. Extraktion der Samenöle	27
C.1.3. Gaschromatographische Analyse der Samenöle	28
C.1.3.1. Methylierung der Fettsäuren	28
C.1.3.2. Analysendaten zur KGC	29
C.1.3.3. Quantitative und qualitative Analyse der FAME aus Samenölen	30

Seite

C.2. Ergebnisse 31
C.2.1. Qualitative Analyse der Fettsäuren aus Oenotherensamenölen über GC/MS 31
C.2.2. Quantitative Analyse der Fettsäuren aus Samenölen 39
C.2.3. Der Samenölgehalt von Oenotheren 40
C.2.4. Die Fettsäurezusammensetzung der Oenotherensamen 44

C.3. Diskussion 50
C.3.1. Zur Methodik 50
C.3.2. Der Einfluß der Kerngenome und des Plasmons auf den Gehalt und die Fettsäurezusammensetzung der Oenotherensamenöle 51

D. Analyse der Blattlipide 54

D.1. Material und Methoden 54
D.1.1. Versuchspflanzen 54
D.1.2. Extraktion und Reinigung der Blattlipide 54
D.1.3. Lipidfraktionierung über Säulenchromatographie 55
D.1.4. Charakterisierung der Lipidfraktion über Dünnschichtchromatographie 57
D.1.5. Prüfung der Reinheit der Lipidfraktionen über Dünnschichtchromatographie 59
D.1.6. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren aus Blattlipiden 59
D.1.6.1. Methylierung der Fettsäuren 59
D.1.6.2. Analysendaten der KGC 60
D.1.6.3. Qualitative und quantitative Analyse der FAME 61

D.2. Ergebnisse 62
D.2.1. Lipidfraktionierung über Säulenchromatographie 62
D.2.2. Analyse der NL, GL und PL aus Blattlipiden von Oenotheren über DC 62
D.2.2.1. Charakterisierung der NL 62
D.2.2.2. Charakterisierung der GL 64
D.2.2.3. Charakterisierung der PL 67
D.2.3. Qualitative Analyse der Fettsäuren aus NL, GL und PL über GC/MS 70
D.2.4. Quantitative Analyse der Fettsäuren von NL, GL und PL 77
D.2.5. Die Lipidzusammensetzung der Blattlipide von Oenotheren 77
D.2.6. Die Fettsäurezusammensetzung der NL, GL und PL in Oenotherenhybriden 80
D.2.6.1. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der NL 80
D.2.6.2. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der GL 82
D.2.6.3. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der PL 85

Seite

D.3. Diskussion 88
D.3.1. Zur Methodik 88
D.3.2. Der Einfluß des Kerngenoms und des Plasmons auf den Gehalt und die Fettsäurezusammensetzung der Neutralen Lipide, Glyko- und Phospholipide 89

E. Allgemeine Diskussion 93

F. Zusammenfassung 98

G. Literaturverzeichnis 100

A. Einleitung

Pflanzliche Eukaryontenzellen enthalten in drei verschiedenen Kompartimenten genetische Information: in den Chromosomen des Zellkerns (in ihrer Gesamtheit als Genom oder Genotypus bezeichnet) sowie in den Organell-Nucleinsäuren der Plastiden und Mitochondrien (in ihrer Gesamtheit als Plasmon oder Plasmotypus* definiert). Ontogenie, Phylogenie und der Betriebsstoffwechsel dieser Zellen werden durch die enge Kooperation von Zellkern- und Organell-DNA gesteuert. Allen drei Arten genetischen Materials ist jeweils ein spezifisches Transkriptions- und Translationssystem zugeordnet. Neben genom- und plasmoncodierten Proteinen sind inzwischen auch einge Enzymproteine identifiziert, die unter dualer genetischer Kontrolle stehen (Übersicht s. HAGEMANN, 1980). Für Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen Genom und Plasmon sowie des Einflusses der extrachromosomalen Konstitution bei diesem Zusammenwirken haben sich die Pflanzen der Gattung Oenothera seit langem als besonders günstige Versuchsobjekte erwiesen: J. SCHWEMMLE (1938) z. B. gelang es, aus den Elternformen Oenothera berteriana und Oenothera odorata (Ordnung Myrtales, Familie Onagraceae, Untergattung Munzia) Bastarde zu gewinnen, die bei identischer Kernkonstitution das Plasmon der einen bzw. der anderen Elternart besitzen.

Die cytogenetische Sonderstellung der Oenotheren beruht auf ihrer Komplexheterozygotie. Die beiden Genomkomplexe der Oenothera berteriana** werden mit B und l, die der Oenothera odorata** mit v und I bezeichnet. In der Meiose werden die

---

* In Anlehnung an MICHAELIS (1954) wird die Gesamtheit der plastidalen Gene als Plastom, die Gesamtheit der mitochondrialen Gene als Chondriom definiert.

** Nach der systematischen Bearbeitung der Gattung Oenothera von DIETRICH (1977) ist Oenothera berteriana als Oenothera villaricae und Oenothera odorata als Oenothera picensis, ssp. picensis einzuordnen.

haploiden Chromosomensätze nur komplexweise rekombiniert, wobei aufgrund von Letalfaktoren fast nie Homozygotie auftritt. Durch reziproke Kreuzungen sowie durch entsprechende Rückkreuzungen lassen sich Bastarde mit den Komplexkombinationen B · v, B · I, l · v und l · I herstellen, die aufgrund der maternalen Vererbung des Plasmons jeweils mit der extrachromosomalen Konstitution der einen respektive der anderen Elternart (d. h. berteriana- oder odorata-Plasmon) ausgestattet sind (vgl. SCHWEMMLE et al., 1938; HAGEMANN, 1964). Durch Selbstung können diese als erbkonstante reine Linien bekannter genetischer Konstitution weitergezogen werden (CLELAND, 1972).

Durch Restriktionsanalysen der plastidalen DNA (ALT, 1980) sowie der mitochondrialen DNA (BRENNICKE, 1979, 1980 und OTTMAR, 1983) ließ sich nachweisen, daß die Restriktionsmuster der cp-DNA und der mt-DNA von Oenotherenformen mit berteriana-Plasmon sich deutlich von denen der Formen mit odorata-Plasmon unterscheiden. Zudem konnte die Konstanz und die Vererbung der cp-DNA und der mt-DNA dieser Oenotherenformen aufgezeigt werden (ALT et al., 1982, BRENNICKE und SCHWEMMLE, 1984). Diese Ergebnisse sind eine Bestätigung der kreuzungsgenetischen Analysen von J. SCHWEMMLE (1938) und liefern zugleich die molekulargenetische Grundlage für Untersuchungen über das Zusammenwirken von Genom und Plasmon bei diesen Oenotheren.

Inzwischen wurde an einigen morphologischen Merkmalen und physiologischen Prozessen der konstante und gerichtete Einfluß des extrachromosomalen Erbgutes nachgewiesen: z. B. auf die photoperiodische Blühreaktion (SCHWEMMLE, B., 1962), die circadiane Rhythmik der Blattbewegung (FREY und SCHWEMMLE, B., 1967), die phytochromgesteuerte L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase(PAL)-Aktivität und ihre Beziehung zur Anthocyansynthese (HACHTEL, 1972, HACHTEL und SCHWEMMLE, 1972), die phytochromgesteuerte Flavonoidsynthese (CHRISTNER, 1973), die Bildung der Chloroplastenmembranproteine (HACHTEL, 1977) sowie die Atmungsaktivität und die Phospholipidzusammensetzung isolierter Mitochondrien (BENZ, 1979).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun das Zusammenwirken von Plasmon und Kerngenom bei der Synthese bzw. Akkumulation zweier für Oenotheren - auch chemotaxonomisch - interessanter Substanzklassen (HEGNAUER, 1969) untersucht werden: der Phenylpropanoide in Blättern sowie der Samenlipide. In einer vorangegangenen Arbeit (BURHENN, 1983) wurde bereits eine gaschromatographische Analyse der phenolischen Komponenten aus Blättern von Oenotheren durchgeführt und dabei ein deutlicher Einfluß des Plasmons auf die Akkumulationsrate von Zimt- und Phenolcarbonsäuren für ein reziprokes Bastardpaar festgestellt. In den Blattextrakten waren in höheren Konzentrationen auch Substanzen zu finden, die noch nicht identifiziert werden konnten. Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst eine Identifizierung der unbekannten Komponenten vorzunehmen, zumal, da auch für die Produktion dieser Substanzen eine Plasmonabhängigkeit vorlag. Zudem sollten die Blätter von zwei reziproken Bastardpaaren analysiert werden, um herauszufinden, ob der Einfluß der extrachromosomalen Konstitution auf die Akkumulation der Zimt- und Phenolcarbonsäuren in den Hybridpaaren gleichgerichtet wirksam ist.

Darüber hinaus erschien die Untersuchung der ölreichen Samen von Oenotheren aus mehreren Gründen interessant. Während der Samenentwicklung werden die Samenöle als Triglyceride de novo synthetisiert und in Ölkörpern akkumuliert. Nach der Samenreife bleiben dort die Triglyceride chemisch unverändert gespeichert. Die Analyse der Triglyceride kann damit das Zusammenwirken von Genom und Plasmon bei der de novo-Synthese der Samenöle aufzeigen. Über diese genetische Kontrolle ist bisher nur bekannt, daß in erster Linie das Kerngenom die Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride steuert (STUMPF, 1975; DOWNEY und HARVEY, 1963; DOWNEY, 1964). Die Fettsäuresynthese findet im Samen in den Proplastiden statt. Die Frage, inwieweit das Plasmon bzw. das Plastom die Enzymproteine für die Fettsäuresynthese in Samen mitcodiert, ist noch nicht geklärt (STUMPF, 1984).

Es war zu erwarten, daß die Samenölanalysen von Oenotherenformen mit identischem Genom, aber unterschiedlichem Plasmon, neue Erkenntnisse hierzu liefern. In jüngster Zeit wurde zudem die pharmazeutische Wirksamkeit der Samenöle der zweijährigen Nachtkerzen Oenothera biennis L. und Oenothera lamarckiana entdeckt (Übersicht s. BECKER, 1983): Die Triglyceride enthalten zu ca. 10 % (MANKU, 1983) die im Pflanzenreich nur sehr selten vorkommende γ-Linolensäure (18 : 3 n-6), die eine wichtige Schlüsselstellung im Prostaglandinstoffwechsel besitzt. In einer Reihe von klinischen Untersuchungen (z. B. KUNKEL et al., 1981, PACCALIN et al., 1983; HORROBIN et al., 1984) konnte nachgewiesen werden, daß sich während der Behandlung mit Nachtkerzenöl (Efamol) Prostaglandinmangelerscheinungen und deren Symptome (z. B. Allergien) entscheidend verbessern ließen. Auch unter diesem Aspekt der pharmazeutischen Nutzbarkeit wurden die Samenöle der einjährigen Oenotheren Oenothera berteriana und Oenothera odorata sowie ihrer reziproken Bastarde analysiert.

Die aus den Blattextrakt- und Samenölanalysen gewonnenen Ergebnisse gaben dazu Anlaß, den Einfluß von Genom und Plasmon auch auf die Fettsäurezusammensetzung und den Gehalt von Blattlipiden der Oenotheren zu überprüfen. Hierzu wurde eine Fraktionierung der charakteristischen Lipidklassen in Neutrale Lipide, Glyko- und Phospholipide durchgeführt und deren individuelle Fettsäurezusammensetzung bestimmt.

Voraussetzung für die vergleichenden Untersuchungen der Zimt- und Phenolcarbonsäuren, der Samenöle und Blattlipide unterschiedlicher Oenotherenformen war die Entwicklung einer jeweils quantitativ und qualitativ reproduzierbaren Gaschromatographie-Analysenmethode.

B. Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

B.1. Material und Methoden

B.1.1. Versuchspflanzen

Zur Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren wurde 5 Wochen altes Blattmaterial der einjährigen Nachtkerzen Oenothera berteriana und Oenothera odorata verwendet. Die genetische Konstitution der untersuchten Oenotherenformen ist in Tabelle 1 angegeben. Die Samen für die Anzucht der Pflanzen stammten aus Nachzüchtungen des Jahres 1973 und wurden bis zur Aussaat bei 8° C ± 2° C trocken im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 1. Genetische Konstitution der untersuchten reziproken Oenotherenformen

Genomkomplexe	Plasmon
B · I	berteriana
B · I	odorata
l · v	berteriana
l · v	odorata

B.1.2. Anzucht der Pflanzen

Die Samen wurden auf zwei Lagen angefeuchtetem Gelbband-Filterpapier (Schleicher und Schüll) in Petrischalen ausgesät und zur Induktion der Keimung für 7 Tage in eine Klimakammer (22° C, Dauer-Weißlicht) gestellt. Die jungen Keimlinge wurden anschließend in Schalen mit Einheitserde (Typ T) pikiert und in einer Klimakammer unter konstanten Bedingungen (Tab. 2) im Langtag (16 : 8) weiter kultiviert.

Tabelle 2. Programm der Klimakammer

Temperatur	23° C während Belichtungsphase (16 h)
	18° C während Dunkelphase (8 h)
Lichtintensität	13 ± 1 mW/cm²
relative Feuchte	80 ± 5 %

B.1.3. Extraktion der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

Zur Extraktion wurden Blätter von fünf Wochen alten Oenotherenpflanzen geerntet, und zwar jeweils das dritte und vierte Blatt oberhalb der Kotyledonen. Diese Blätter wurden mit Leitungswasser und H_2O dest. gründlich gewaschen, nach Entfernen der Mittelrippe sofort in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Das trockene Blattmaterial wurde in einer Schlagkreuzmühle (nach Culatti, Maschenweite des Siebes 0,5 mm) fein gepulvert und bei -18° C im Exsikkator aufbewahrt.

Die Extraktion der Zimt- und Phenolcarbonsäuren erfolgte nach dem Soxhlett-Extraktionsverfahren.

Einwaage in die Extraktionshülsen:	je 3,00 g gefriergetrocknetes, pulverisiertes Blattmaterial
Extraktionsmittel:	je 100 ml EtOH/MeOH
Extraktionsdauer:	16 h unter N_2-Zufuhr als Oxidationsschutz

B.1.4. Aufarbeitung des Extraktes

Die Aufarbeitung des methanolisch/ethanolischen Extrakts wurde weitgehend nach den Methoden von SUMERE (1972) und NEWBY (1980) durchgeführt. Die einzelnen Aufarbeitungsschritte wurden für alle Oenotherenformen identisch vorgenommen; sie sind in folgendem Flußdiagramm in kurzer Form dargestellt:

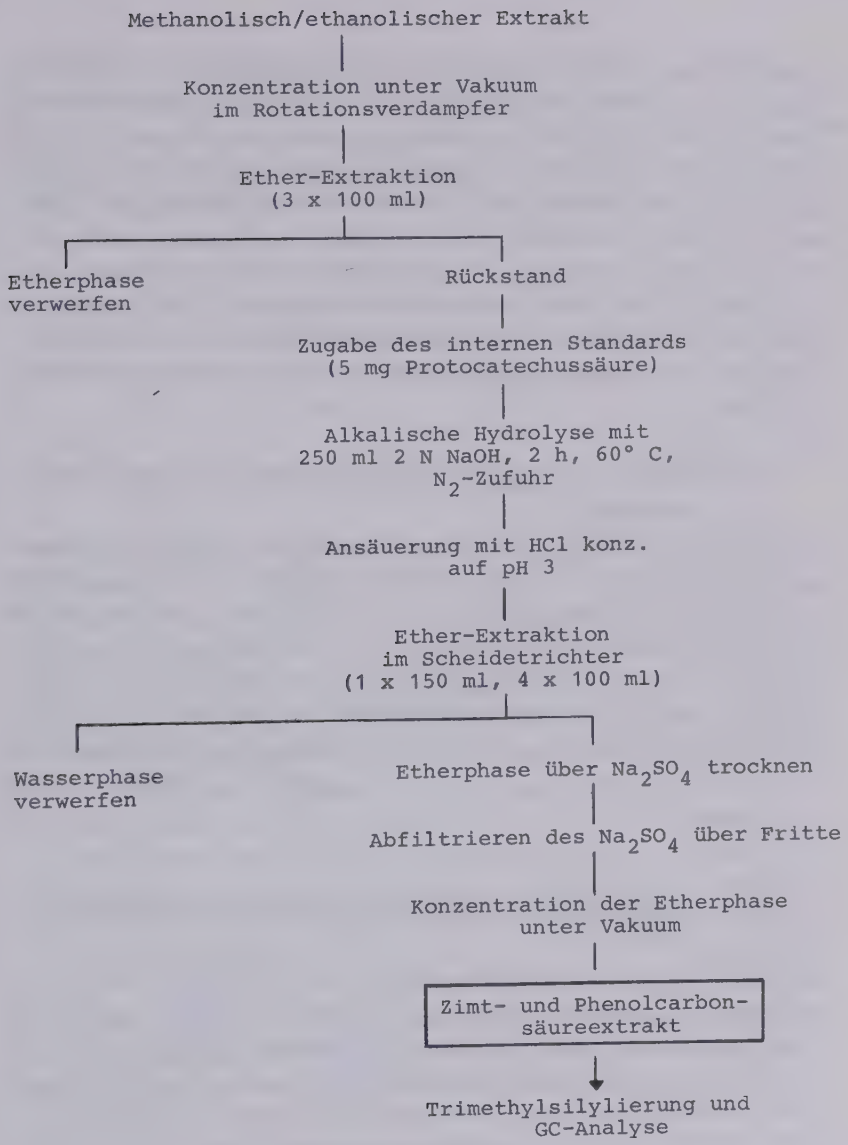


Abb. 1. Flußdiagramm zur Aufarbeitung des methanolisch/ethanolischen Extrakts aus Oenotherenblättern.

Nach diesem Verfahren werden die Zimt- und Phenolcarbonsäuren bei der alkalischen Hydrolyse schonend von ihren Amid-, Ester- oder lipidischen Bindungen gelöst und lassen sich bei pH 3 als freie Säuren mit Ether extrahieren. Vor der Hydrolyse wird zur Kontrolle der Aufarbeitungsschritte als interner Standard Protocatechussäure (Roth) in jeweils gleicher Menge (5 mg) zugegeben. Die Etherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, da bei der anschließenden Trimethylsilylierung der Zimt- und Phenolcarbonsäuren für die gaschromatographische Analyse Feuchtigkeit in den Proben ausgeschlossen werden muß.

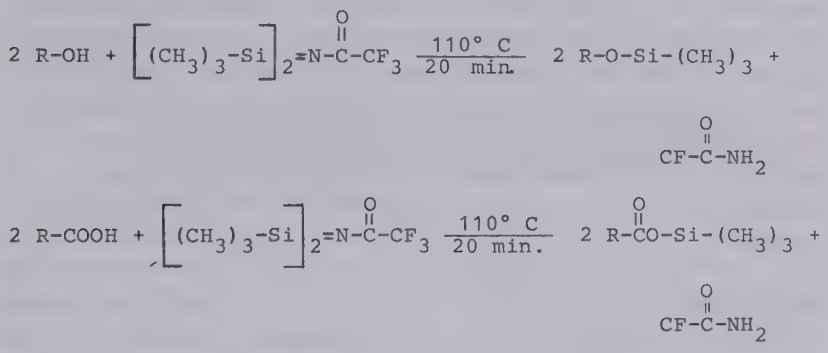
B.1.5. Gaschromatographische Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

Die Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren erfolgte über Kapillargaschromatographie (KGC). Diese stellt hinsichtlich der Analysengeschwindigkeit, des Trennvermögens und der Zuverlässigkeit der qualitativen und quantitativen Ergebnisse eine der leistungsfähigsten analytischen Methoden der Organischen Chemie dar. Das prinzipielle Trennverfahren sowie der Aufbau gaschromatographischer Apparaturen wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit (BURHENN, 1983) ausführlich erläutert.

B.1.5.1. Trimethylsilylierung der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

Freie Zimt- und Phenolcarbonsäuren sind für eine direkte KGC-Analyse zu wenig flüchtig, sie müssen deshalb quantitativ mit entsprechenden Reagenzien zunächst noch in höher flüchtige, stabile Derivate umgesetzt werden. Hierfür eignet sich ausgezeichnet eine Trimethylsilylierung mit N,O-Bis-(trimethylsilyl-)trifluoracetamid (BSTFA) als Silylierungsreagenz.

Bei der Herstellung der Trimethylsilyl(TMS)-Derivate findet folgende chemische Reaktion statt (SUMERE, 1976):



Das Silylierungsreagenz greift an den Hydroxyl- und Carboxylgruppen der Zimt- und Phenolcarbonsäuren (R) an, wobei das Wasserstoffatom der OH- bzw. COOH-Gruppe durch eine TMS-Gruppe ersetzt wird. Der Vorteil von BSTFA gegenüber anderen Silylierungsreagenzien besteht darin, daß es den Flammenionisationsdetektor des Gaschromatographen weniger verunreinigt, da sich in der Flamme statt SiO_2 hauptsächlich SiF_4 bildet (SUMERE, 1976).

Zur Silylierung wird der konzentrierte Extrakt zunächst in 5 ml Essigester gelöst. Hiervon werden 0,5 ml entnommen, in ein Head-Space-Gläschen einpipettiert und mit 200 µl BSTFA versetzt. Die Ampulle wird mit einer Bördelkappe (Teflondichtung) verschlossen, für 20 min. in einen Trockenschrank bei 110° C gestellt und zwischendurch zur Beschleunigung der Silylierungsreaktion vorsichtig geschüttelt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur werden aus der Probe 0,3 µl mit einer Microliterspritze entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt.

B.1.5.2. Analysendaten zur KGC

Zur KGC-Analyse diente ein Varian Series 2700-Gaschromatograph. Dieses ursprünglich nur für gepackte Säulen geeignete Gerät wurde für den Gebrauch von Kapillarsäulen umge-

baut, wobei die Dimensionierung des Injektor- und Detektorteils verändert werden mußte. Das strömungsgeregelte Trägergassystem wurde durch einen Druckregler ersetzt und ein zusätzlicher Make-up-Gasstrom zur Erhöhung der Detektorempfindlichkeit eingebaut. Das Trägergassystem erhielt einen Splitter, am Injektionsblock wurde eine Septumspülung angebracht. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet, der gegenüber Stickstoff bei höheren Temperaturen aufgrund geringerer Zähigkeit zu einer besseren Trennleistung der Kapillarsäule beiträgt.

Analysendaten:

a) Gaschromatograph:	Varian Series 2700
b) Schreiber:	Siemens Kompensograph III
Spannung:	3 mV
Papiervorschub:	1 cm/min.
c) Integrator:	Spectraphysics, System I
d) Quarzkapillare: (Fused Silica)	25 m x 0,2 mm (i. D.)
Stationäre Phase:	SE 54 (Kohlenwasserstoffgemisch auf Silikonbasis, quervernetzt, unpolar)
Filmdicke der stat. Phase:	0,2 µm
Betriebstemperatur:	60° C - 350° C
e) Trägergas:	H_2; Vordruck 0,7 bar
Split-Rate:	1 : 40
f) Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Gase für die Flamme:	H_2: 30 ml/min. synth. Luft: 300 ml/min.
g) Temperaturprogramm:	120° C - 280° C Heizrate 4° C/min.
Injektortemperatur:	330° C
Detektortemperatur:	330° C

h) Injektionsmenge: 0,3 µl

i) Elektrometer
Empfindlichkeit: 10^{-12}
Attenuation: Stufe 2

B.1.5.3. Qualitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren über Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die gaschromatographische Auftrennung der einzelnen Zimt- und Phenolcarbonsäuren führt zu charakteristischen Retentionszeiten der Komponenten. Die Identifizierung der Peaks aus den Gaschromatogrammen erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen bekannter Referenzsubstanzen.

Zur Aufklärung der Substanzen wurde auch die Massenspektrometrie herangezogen. Das Prinzip der GC/MS-Kopplung wurde bereits früher (BURHENN, 1983) erläutert.

Die Elektronen-Impakt-Massenspektren (80 eV) der Zimt- und Phenolcarbonsäuren-TMS-Derivate wurden mit einem MAT 112S-(Varian)-Massenspektrometer/Carlo Erba 2900-Gaschromatographen aufgenommen. Alle Analysendaten wurden aus der KGC-Analyse übernommen, anstatt Wasserstoff wurde jedoch Helium als Trägergas verwendet.

B.1.5.4. Quantitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

Während der GC-Analysen werden die Peakflächen der einzelnen Substanzen über einen elektronischen Integrator berechnet. Um die Substanzmengen verschiedener Oenotherenformen miteinander vergleichen zu konnen, werden nicht die Absolutflächen der Peaks beurteilt, sondern das Verhältnis der einzelnen Komponenten zum jeweils identisch eingewogenen internen Standard in der Probe errechnet.

Funktion des internen Standards: Bei vergleichenden quantitativen Analysen ist die Zugabe eines internen Standards erforderlich. Damit die einzelnen Aufarbeitungsschritte kontrolliert werden können, sollte er sich chemisch ähnlich verhalten wie die zu analysierenden Substanzen, wenn möglich aus derselben Substanzklasse stammen. Zudem sollte der interne Standard in der den Probenkomponenten entsprechenden Konzentrationen zugewogen werden und eine hohe Wiederfindungsrate (möglichst > 95 %) aufweisen.

All diese Anforderungen werden von Protocatechussäure für die Analytik der Zimt- und Phenolcarbonsäuren erfüllt.

Eine Quantifizierung in mg erfolgt über die entsprechenden Relativen Response-Faktoren (RRF) der einzelnen Substanzen. Die RRF-Werte müssen unbedingt berücksichtigt werden, da die Zimt- und Phenolcarbonsäuren bei gleicher Einwaage aufgrund ihrer charakteristischen Molekülstruktur ein unterschiedliches Signal im Detektor erzeugen.

Zur Bestimmung der RRF-Werte wird eine 0,1 % Eichstandardmischung (Roth) aus

- Protocatechussäure (3,5-Dihydroxybenzoesäure)
- Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure)
- p-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure)
- Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure)
- Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxy-zimtsäure)

hergestellt und gaschromatographisch analysiert.

Die RRF-Werte der Substanzen werden nun über ihre entsprechenden Flächeneinheiten (FE) im Vergleich mit den FE des internen Standards berechnet:

$$RRF_{Substanz} = \frac{FE_{Substanz}}{FE_{interner\ Standard}} \quad \text{bei identischer Einwaage}$$

Die Substanzmengen aus verschiedenen Extrakten können so direkt in mg angegeben und miteinander verglichen werden, indem sowohl die Relation zum internen Standard in der Probe als auch die charakteristischen RRF-Werte der einzelnen Komponenten berücksichtigt werden:

$$\text{mg Substanz} = \frac{FE_{\text{Substanz}}}{FE_{\text{interner Standard}}} \times \frac{mg_{\text{Einwaage int. St.}}}{RRF_{\text{Substanz}}}$$

Einwaage des internen Standards Protocatechussäure bei den Zimt- und Phenolcarbonsäuren: 5 mg

Nach der oben genannten Formel wurden auch die quantitativen Analysen der Samen- und Blattlipide (Teil C und D) durchgeführt.

B.1.5.5. Statistik

Zur statistischen Absicherung der Daten wurden der Mittelwert aus den einzelnen Versuchen und die Standardabweichung berechnet. Da diese Angaben für eine signifikante Unterscheidung der Ergebnisse ausreichten, konnte auf weitere statistische Prüfverfahren verzichtet werden.

B.2. Ergebnisse

B.2.1. Qualitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren über GC/MS

Die Zimt- und Phenolcarbonsäuren aus Blattextrakten von Oenotheren wurden als TMS-Ester nach B.1.5. gaschromatographisch analysiert. Abb. 2, S. 15, zeigt ein typisches Gaschromatogramm der untersuchten Komponenten.

Die Identifizierung der einzelnen Peaks aus den Gaschromatogrammen erfolgte wie beschrieben über Massenspektrometrie (B.1.5.3.). Die in der vorangegangenen Arbeit (BURHENN, 1983) noch unbekannten Peaks mit der Massenzahl M 328 und M 350 wurden mit Hilfe einer Massenspektrenbibliothek als TMS-Ester der Palmitinsäure bzw. der α-Linolensäure identifiziert. Peak Nr. 8 mit M 352 konnte dem TMS-Ester der Linolsäure, Peak Nr. 10 mit M 356 dem TMS-Ester der Stearinsäure zugeordnet werden.

Die Retentionszeiten der Zimt- und Phenolcarbonsäuren sowie der nun identifizierten Fettsäuren wurden zur Absicherung der Ergebnisse mit denen bekannter Referenzsubstanzen verglichen. Nach der Zuspritzmethode wurde ein Blattextrakt zusammen mit einer Mischung aller identifizierten Referenzsubstanzen in den GC eingespritzt; dabei ergab sich eine exakte Übereinstimmung der Retentionszeiten für jede Einzelkomponente.

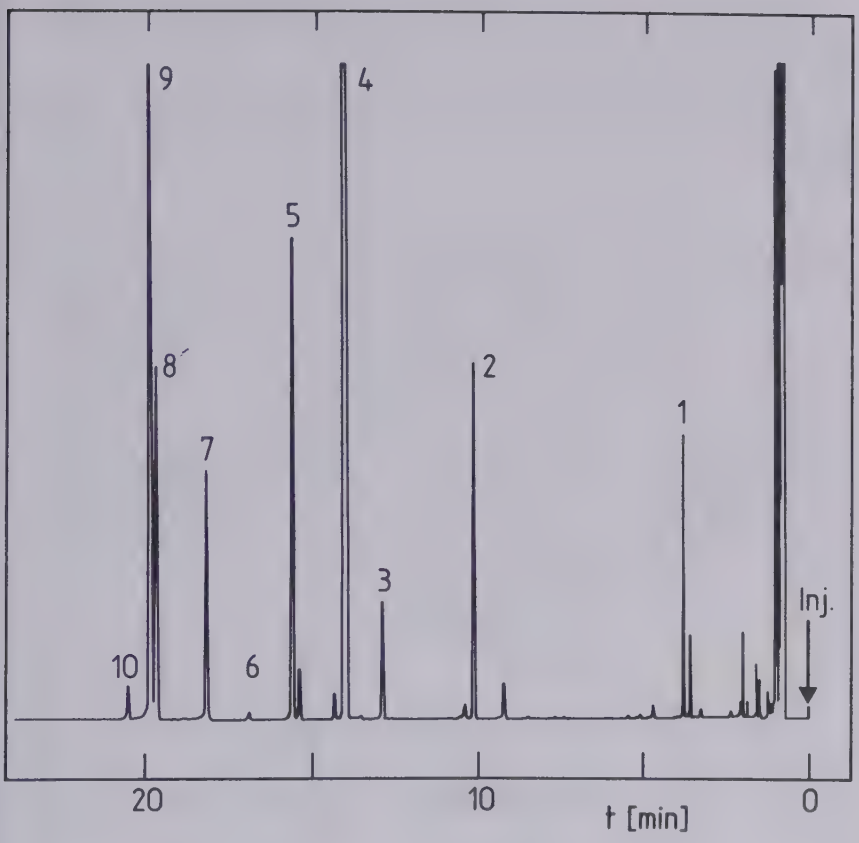


Abb. 2. Typisches Gaschromatogramm der TMS-Derivate von Zimt- und Phenolcarbonsäuren sowie von Fettsäuren aus Blattextrakten von Oenotheren. Nach dem Lösungsmittelpeak folgen

(1) Stabilisator aus Ether
(2) Protocatechussäure, interner Standard
(3) p-Cumarsäure
(4) Gallussäure
(5) Palmitinsäure (16 : 0)
(6) Ferulasäure
(7) Kaffeesäure
(8) Linolsäure (18 : 2 n-6)
(9) α-Linolensäure (18 : 3 n-3)
(10) Stearinsäure (18 : 0)

Inj. = Zeitpunkt der Einspritzung

In der folgenden Tabelle 3 sind die Massenzahlen der identifizierten Substanzen sowie deren charakteristische Ionen in den Massenspektren angegeben. Die einzelnen Peaks sind entsprechend ihrer Reihenfolge im Gaschromatogramm (Abb. 2) aufgelistet.

Tabelle 3. Molekülionenpeak (M) und Substanzname der über GC/MS identifizierten Peaks sowie deren charakteristische Ionen und Basispeaks (BP). Die Angaben von M beziehen sich auf die TMS-Derivate. m/e = Ionenmasse/Ionenenergie

Peak Nr.	Masse (M) Substanz bei m/e	Name der Substanz	charakteristische Ionen bei m/e	BP bei m/e
1	220	Stabilisator aus Diethylether		
2	370	Protocatechussäure, interner Standard	193, 311, 355	73
3	308	p-Cumarsäure	219, 249, 293	73
4	458	Gallussäure	281, 443	73
5	328	Palmitinsäure	117, 131, 145, 313	73
6	338	Ferulasäure	249, 308, 323	73
7	396	Kaffeesäure	191, 219, 381	73
8	352	Linolsäure	117, 207, 262, 337	75
9	350	α-Linolensäure	95, 108, 335	75
10	356	Stearinsäure	117, 131, 145, 341	73

Der Molekülionenpeak (M) stellt in den Massenspektren das Signal bei höchster Masse dar. Meist treten auch $(M + 1)^+$-Signale und $(M + 2)^+$-Signale auf (vgl. Massenspektren der Zimt- und Phenolcarbonsäuren, S. 17 - 18), die durch die Anlagerung von einem bzw. zwei H^+-Ionen an die Moleküle zustande kommen. Zudem kann der Molekülionenpeak von einem oder mehreren Isotopenpeaks begleitet sein. Der Basispeak (BP) ist der intensivste Peak des Spektrums. Die TMS-Ester der Zimt- und Phenolcarbonsäuren konnten anhand der Massenspektrendaten von MORITA (1972), HORMAN und VIANI (1970), HARTLEY und JONES (1974), FENTON et al. (1978) und SCHULZ und HERRMANN (1980) als Gallussäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure identifiziert werden. In den folgenden Abb. 3 und Abb. 4 sind die Massenspektren der Kaffeesäure und Gallussäure dargestellt. Die Massenspektren der TMS-Ester von Ferula- und p-Cumarsäure sowie das typische Fragmentierungsschema von phenolischen Komponenten wurden bereits früher (BURHENN, 1983) gezeigt.

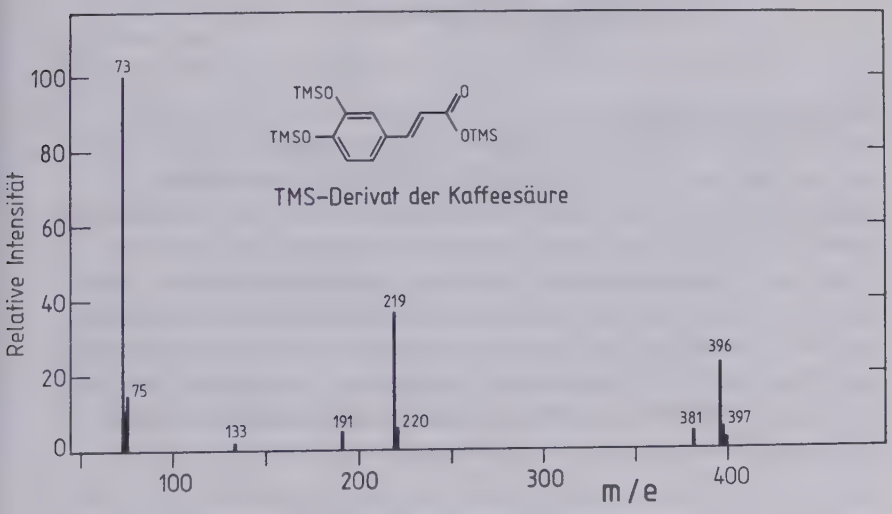


Abb. 3. Massenspektrum des TMS-Derivats der Kaffeesäure. Molekülionenpeak bei m/e 396
m/e = Ionenmasse/Ionenenergie

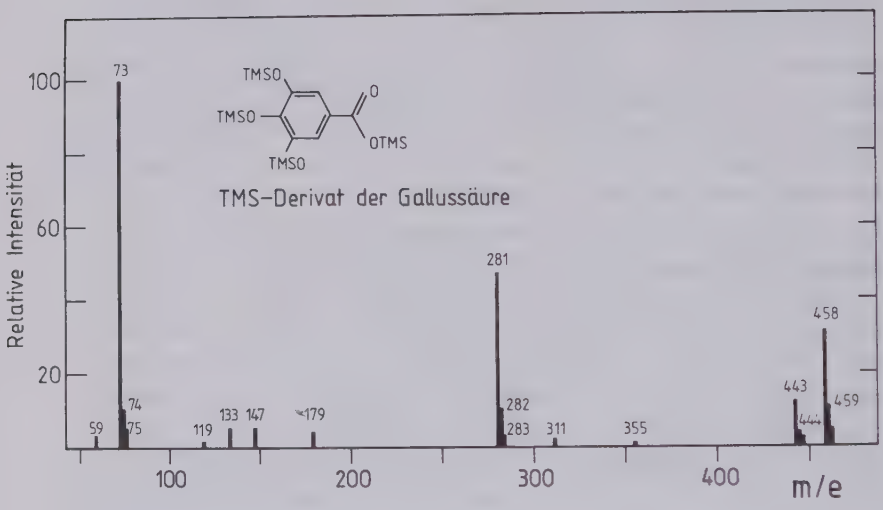


Abb. 4. Massenspektrum des TMS-Derivats der Gallussäure.
Molekülionenpeak bei m/e 458
m/e = Ionenmasse/Ionenenergie

Die über Massenspektrometrie identifizierten Substanzen (Tab. 3) kamen - wenn auch z. T. nur in Spuren - in allen Blattextrakten von Oenotheren vor. Für die nachfolgende quantitative Betrachtung wird auf die Analyse der hier aufgeführten Fettsäuren verzichtet. Die Fettsäuren, die während der Aufarbeitung der Zimt- und Phenolcarbonsäuren mit extrahiert werden, stammen aus polaren Glyko- und Phospholipiden. Diese werden später (Teil D) auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht. Das hierfür verwendete Blattmaterial stammte aus der gleichen Anzucht wie das für die Untersuchungen der Zimt- und Phenolcarbonsäuren.

Ebenso wird auf die Darstellung der Massenspektren der TMS-Derivate von Fettsäuren an dieser Stelle verzichtet, da diese in Teil C und D der Arbeit als Fettsäuremethylester massenspektrometrisch analysiert und abgebildet werden.

B.2.2. Quantitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren

Die für die quantitative Analyse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren notwendigen RRF-Werte wurden nach B.1.5.4. (S. 11) über Gaschromatographie im Vergleich zum internen Standard Protocatechussäure ermittelt und sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. RRF-Werte der Zimt- und Phenolcarbonsäuren in bezug auf Protocatechussäure. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Eichstandardanalysen.

	RRF-Wert
Gallussäure	1,02 ± 0,010
p-Cumarsäure	0,82 ± 0,007
Ferulasäure	0,57 ± 0,009
Kaffeesäure	0,74 ± 0,001

B.2.3. Akkumulation von gebundenen Zimt- und Phenolcarbonsäuren in Oenotherenblättern

Die Blätter der reziproken Hybriden mit den Genomkomplexen B und I sowie 1 und v mit odorata- bzw. berteriana-Plasmon wurden auf ihren Gehalt an Zimt- und Phenolcarbonsäuren hin miteinander verglichen. Aus Tabelle 5 geht hervor, daß sowohl bei den B · I-Formen als auch bei den 1 · v-Hybriden jeweils die Formen mit berteriana-Plasmon signifikant höhere Mengen an sekundären Pflanzenstoffen produzieren.

Tabelle 5. Vergleich der gebundenen Zimt- und Phenolcarbonsäuren (in mg/g TG) aus Blattextrakten fünf Wochen alter Oenotheren (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je sechs separaten Extraktionen).
+ : nur in Spuren (< 0,01 mg) vorhanden (für quantitative Vergleiche nicht geeignet)
Pl. = Plasmon; bert. = berteriana, od. = odorata

Genom- Pl. komplexe	p-Cumarsäure	Gallussäure	Ferulasäure	Kaffeesäure
B · I bert.	0,18 ± 0,003	4,80 ± 0,18	+	2,07 ± 0,07
B · I od.	0,15 ± 0,011	3,15 ± 0,12	+	0,86 ± 0,06
l · v bert.	0,15 ± 0,006	2,19 ± 0,03	0,07 ± 0,006	1,67 ± 0,02
l · v od.	0,10 ± 0,003	1,02 ± 0,01	0,07 ± 0,002	0,70 ± 0,02

Als Hauptkomponente der Zimt- und Phenolcarbonsäuren wird in den Blättern aller Hybridformen die für Oenotheren typische Gallussäure akkumuliert. Aus der Reihe der Zimtsäurederivate nimmt Kaffeesäure den höchsten Anteil ein. Gebundene Ferula- und p-Cumarsäure treten in nur geringen Mengen (< 0,2 mg/g TG) in den Oenotherenblättern auf.

Abb. 5 und Abb. 6 veranschaulichen, wie drastisch sich der Einfluß der extrachromosomalen Konstitution auf die Produktion von Zimt- und Phenolcarbonsäuren auswirkt.

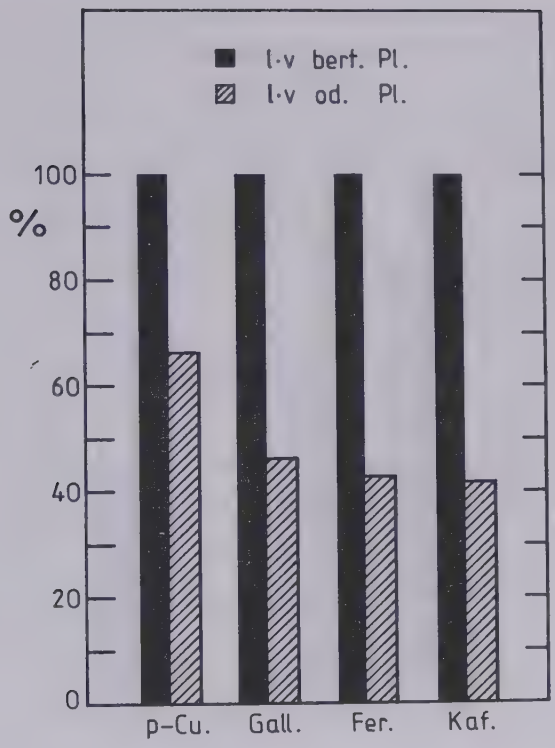


Abb. 5. Quantitativer Vergleich der Zimt- und Phenolcarbonsäuren aus Blättern der reziproken 1 · v-Hybriden mit berteriana-Plasmon (bert.-Pl.) und odorata-Plasmon (od.-Pl.).
Der höhere Wert der Form mit berteriana-Plasmon wurde 100 % gesetzt. Die Standardabweichung liegt bei nur 1 - 3 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs unabhängigen Extraktionen) und wurde graphisch nicht dargestellt.
p-Cu. = p-Cumarsäure; Gall. = Gallussäure; Fer. = Ferulasäure; Kaf. = Kaffeesäure

Bei den reziproken Bastarden mit den Genomkomplexen 1 und v akkumuliert die Form mit berteriana-Plasmon mehr als die doppelte Menge an Gallus-, Ferula- und Kaffeesäure in den Blättern; p-Cumarsäure wird von der Hybride mit odorata-Plasmon zu ca. 30 % weniger produziert.

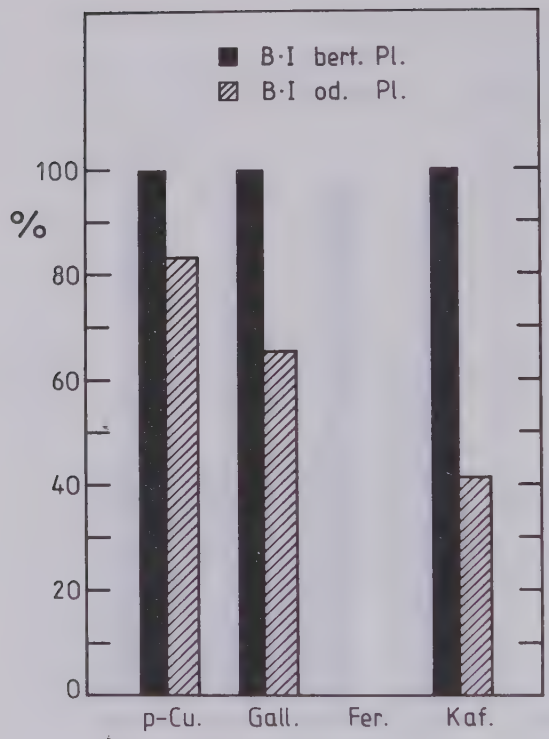


Abb. 6. Quantitativer Vergleich der Zimt- und Phenolcarbonsäuren der reziproken B · I-Hybriden mit berteriana-Plasmon (bert.-Pl.) und odorata-Plasmon (od.-Pl.)
Der höhere Wert der Form mit berteriana-Plasmon wurde 100 % gesetzt. Die Standardabweichung liegt bei nur 1 - 3 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs unabhängigen Extraktionen) und wurde graphisch nicht dargestellt.
p-Cu. = p-Cumarsäure; Gall. = Gallussäure; Kaf. = Kaffeesäure; Fer. = Ferulasäure (hier wegen zu geringer Mengen für quantitative Vergleiche ungeeignet).

In den Blättern der Oenotherenformen mit den Genomkomplexen B und I (Abb. 6) sind die quantitativen Unterschiede im Gehalt an alkalisch hydrolisierbaren Zimt- und Phenolcarbonsäuren nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den 1 · v-Formen. Im Falle der Kaffeesäure weist wiederum die Hybride mit berteriana-Plasmon mehr als die doppelte Menge auf, p-Cumar- und Gallussäure sind aber nur zu 15 % bzw. 35 % weniger in Blättern der Form mit odorata-Plasmon zu finden. Die geringen Mengen an Ferulasäure in beiden Hybridformen (vgl. Tab. 5) eigneten sich nicht für einen quantitativen Vergleich.

Untersucht man den Einfluß der Genomkomplexe auf den Gehalt an Zimt- und Phenolcarbonsäuren, so zeigt sich, daß die Hybridformen mit den B · I-Genomkomplexen gegenüber den 1 · v-Hybriden höhere Mengen an phenolischen Komponenten aufweisen (Tab. 5). In Kombination mit den B · I-Genomkomplexen führt der Einfluß des Plasmons zu größeren quantitativen Unterschieden bei den einzelnen Substanzen als in Kombination mit den 1 · v-Genomkomplexen.

B.3. Diskussion

B.3.1. Zur Methodik

Die in den Gaschromatogrammen der vorangegangenen Arbeit (BURHENN, 1983) noch unbekannten Substanzen mit den Massenzahlen 328, 350 und 356 konnten als TMS-Ester der Palmitin-, α-Linolen- und Stearinsäure identifiziert werden. Aufgrund der besseren Trennleistung der Kapillarsäule "SE 54" gegenüber der früher verwendeten "SE 30" ließ sich Linolsäure (M 352) von α-Linolensäure trennen. Diese Fettsäuren wurden bei der Hydrolyse der Blattextrakte von ihren Esterbindungen an polare Glyko- und Phospholipide abgespalten. Ein quantitativer Vergleich der auf diese Weise extrahierten Fettsäuren aus den Blättern der verschiedenen Oenotherenhybriden ist nun nur wenig aussagekräftig, da die einzelnen Fettsäuren den Glyko- und Phospholipiden nicht individuell zugeordnet werden können. Die quantitativen Unterschiede jedoch gaben dazu Anlaß, mit gleichem Blattmaterial nochmals eine Analyse dieser wichtigen Membranlipide durchzuführen und auf ihre Fettsäurezusammensetzung zu prüfen (s. Teil D).

Der folgende Abschnitt der Diskussion befaßt sich daher ausschließlich mit der Substanzklasse der Zimt- und Phenolcarbonsäuren.

B.3.2. Der Einfluß der Kerngenome und des Plasmons auf den Gehalt an Zimt- und Phenolcarbonsäuren in Oenotherenblättern

Die Analysen der Zimt- und Phenolcarbonsäuren aus Oenotherenblättern von Hybriden mit identischen Genomkomplexen, aber unterschiedlichem Plasmon, ergaben eindeutig, daß die extrachromosomale Konstitution einen entscheidenden Einfluß auf die Akkumulation von sekundären Pflanzenstoffen ausübt: Sowohl bei den Hybriden mit den Genomkomplexen B und I als auch bei den l · v-Formen weisen die Hybriden mit berteriana-Plasmon gleichgerichtet höhere Mengen an Zimt- und Phenolcarbonsäuren auf (Abb. 5 und Abb. 6). Der Gehalt an alkalisch hydrolysierbarer Gallussäure, p-Cumarsäure sowie

Ferula- und Kaffeesäure in den Blättern wird aber gleichzeitig auch von den Genomkomplexen gesteuert. Ein quantitativer Vergleich der Substanzen zwischen den beiden Bastardpaaren zeigt, daß die B · I-Genomkomplexe die Synthese der Zimt- und Phenolcarbonsäuren stärker als die l · v-Genomkomplexe fördern (Tab. 5). Je nachdem, mit welchen Kerngenomen dann die Plasmone kombiniert sind, wird die Akkumulation der phenolischen Komponenten unterschiedlich stark beeinflußt. So manifestiert sich der Einfluß des berteriana-Plasmons in B · I-Hybriden in einem 30 - 50 % höheren Gehalt der einzelnen Zimt- und Phenolcarbonsäuren gegenüber der Form mit odorata-Plasmon; bei den l · v-Hybriden sind diese Unterschiede geringer.

Hieraus kann man schließen, daß die Akkumulation der phenolischen Substanzen offensichtlich von spezifischen Kerngenom-Plasmon-Interaktionen gesteuert wird.

Im Teil E der vorliegenden Arbeit wird eine Beteiligung des Plasmons bei der Regulation der für die Synthese der Zimt- und Phenolcarbonsäuren verantwortlichen Enzyme diskutiert.

C. Analyse der Samenöle

C.1. Material und Methoden

C.1.1. Oenotherensamen

Zur Analyse der Samenöle wurden geselbstete einjährige Oenotherensamen des Jahrgangs 1973 verwendet. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde mit Samen der Jahrgänge 1980 und 1983 überprüft. Die genetische Konstitution der untersuchten Oenotherenformen ist in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6. Genetische Kontitution der zur Samenölanalytik verwendeten Oenotherenformen

Genomkomplexe	Plasmon	Selbstung aus dem Jahr
B · l	berteriana	1973
v · I	odorata	1973
v · I	berteriana	1973
B · I	berteriana	1973, 1983
B · I	odorata	1973, 1983
l · I	berteriana	1973
l · v	berteriana	1973, 1983
l · v	odorata	1973, 1983
B · v	berteriana	1973, 1980
B · v	odorata	1973, 1980

Für vergleichende Analysen wurden auch die Samen zweijähriger Oenotherenformen (Tab. 7) auf ihren Gehalt an Triglyceriden untersucht. Die Samen stammen von Pflanzen des Jahrgangs 1983 aus dem Botanischen Garten Tübingen.

Tabelle 7. Systematische Bezeichnung der untersuchten zweijährigen Oenotherenformen

Oenotherenformen	Jahrgang
Oenothera biennis L.	1983
Oenothera lamarckiana de VRIES mut. blandina	1983
Oenothera lamarckiana de VRIES mut. erythrosepala	1983

Das Samenmaterial wurde bis zur Analyse bei 8° C ± 2° C trokken im Kühlschrank aufbewahrt.

C.1.2. Extraktion der Samenöle

Für die Untersuchung der Samenöle wurden ausschließlich reife Samen ausgesucht. Vor der Extraktion wurde das Samenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die ölhaltigen Embryonen konnten auf diese Weise leicht aufgeschlossen werden, da die Samenschalen während des Mörservorganges aufplatzen. Nach anschließendem Gefriertrocknen wurden die Samen bis zur Analyse im Exsikkator bei -18° C aufbewahrt.

Die Extraktion der Samenöle erfolgte in einer Soxhlett-Apparatur.

Einwaage in die Extraktionshülse:	1,5 g gefriergetrocknete Samen
Extraktionsmittel:	200 ml n-Hexan
Extraktionsdauer:	14 h unter N_2-Zufuhr als Oxidationsmittel

Zur quantitativen Analyse und zur Kontrolle der Extraktion wurde als interner Standard jeweils 60 mg Heptadecansäure (17 : 0) in die Extraktionshülse eingewogen.

Die Samenölextrakte, die Triglyceride und freie Fettsäuren (~ 2 %, bestimmt durch Titration mit 0,1 M methanolischer NaOH) enthalten, wurden auf ein Volumen von 10 ml zur anschließenden GC-Analyse konzentriert.

C.1.3. Gaschromatographische Analyse der Samenöle

C.1.3.1. Methylierung der Fettsäuren

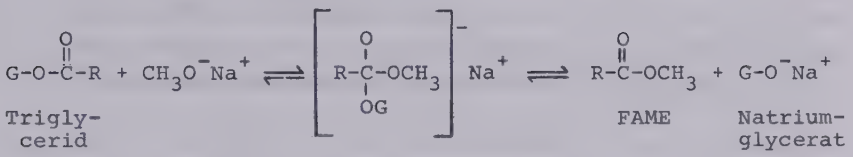
Zur gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Samenölen ist eine Transmethylierung der Triglyceride sowie eine Veresterung der freien Fettsäuren notwendig. Hierzu wurde die Methode nach BADINGS und DE JONG (1983) übernommen.

Für die Methylierung der Fettsäuren wurden folgende Aufarbeitungsschritte durchgeführt:

- 1 ml Samenölextrakt + 6 ml n-Heptan in Kulturröhrchen einpipettieren (Sovirel, Nutzvolumen 8 ml, Deckel mit Teflondichtung)
- Probe mit Vortex-Mixer kräftig 2 min. lang schütteln
- Zugabe von 1 ml 20 % HCl (gasförmig!)/MeOH
- Probe 15 min. schütteln im Wasserbad bei 85° C Schüttelfrequenz: 200/min.
- Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 2500 rpm (3 min.).

Nach der Zentrifugation bildet sich ein Zweiphasensystem aus. In der Oberphase befinden sich die Fettsäuremethylester (FAME), in der Unterphase bleiben die ausgefällten Natriumglycerate zurück.

Während der Transmethylierung findet folgende chemische Reaktion statt:



G = Glycerinrest
R = Fettsäurerest

Zur quantitativen Transmethylierung sind die Schüttelvorgänge essentiell. Außerdem muß der Zutritt von Feuchtigkeit in den Proben vermieden werden, um eine Bildung von NaOH auszuschließen, die zu einer teilweisen Verseifung der Proben führen würde. Man darf deshalb nur getrocknetes MeOH zur Herstellung der Natriummethanolatlösung und der HCl-MeOH-Lösung verwenden.

C.1.3.2. Analysendaten zur KGC

Die gaschromatographische Analyse der FAME konnte wie schon bei den Phenolcarbonsäuren mit der unpolaren "SE 54"-Kapillarsäule durchgeführt werden. Die Fettsäuren werden nach ihrer Kettenlänge getrennt, wobei kürzerkettige Fettsäuren kürzere Retentionszeiten aufweisen. Bei unpolaren Säulen erscheinen nach dem Grad ihrer Desaturierung die ungesättigten Fettsäuren vor der entsprechenden gesättigten Fettsäure, also z. B. mit der Sequenz 18 : 3 → 18 : 2 → 18 : 1 → 18 : 0.

Zur FAME-Analytik wurden folgende Analysendaten gegenüber B.1.5.2., S. 9, verändert:

- Temperaturprogramm: 125° C - 240° C
  Heizrate 4° C/min.
- Detektortemperatur: 300° C
- Injektortemperatur: 275° C

C.1.3.3. Quantitative und qualitative Analyse der FAME aus Samenölen

Die Identifizierung der einzelnen FAME erfolgte über GC/MS (vgl. B.1.5.3., S. 11). Alle Analysendaten wurden hierfür aus dem Programm der KGC-Analyse der FAME übernommen.

Zur quantitativen Berechnung der FAME in mg war wie schon bei den Zimt- und Phenolcarbonsäuren eine Bestimmung des Responsefaktors jeder einzelnen Komponente in bezug auf Heptadecansäuremethylester (17 : 0) notwendig, da auch Fettsäuren bei gleicher Konzentration je nach Kettenlänge und Desaturierungsgrad ein individuelles Signal im Detektor erzeugen. Die RRF-Werte wurden mit einer 0,1 % Eichstandardmischung aus Methylestern (Sigma, Supelco) von:

Palmitinsäure (16 : 0)
Palmitoleinsäure (16 : 1 n-7)
Heptadecansäure (17 : 0)
Stearinsäure (18 : 0)
Ölsäure (18 : 1 n-11)
Linolsäure (18 : 2 n-6)
α-Linolensäure (18 : 3 n-9)
γ-Linolensäure (18 : 3 n-6)

gaschromatographisch bestimmt.

Heptadecansäuremethylester ist für quantitative FAME-Analysen hervorragend geeignet, da er alle notwendigen Funktionen eines internen Standards erfüllt (vgl. S. 12). Die Daten in mg FAME berücksichtigen nach der Formel von B.1.5.4. (S. 13) sowohl die Relation der FAME zu 17 : 0 in den Proben als auch deren charakteristischen RRF-Werte (Einwaage des internen Standards: 60 mg).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach B.1.5.5. (S. 13).

C.2. Ergebnisse

C.2.1. Quantitative Analyse der Fettsäuren aus Oenotheren-Samenölen über GC/MS

Die Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride von Oenotherensamen wurde gaschromatographisch bestimmt. Abb. 7 zeigt ein typisches Gaschromatogramm der Fettsäuren aus den Samenölen; die Fettsäuren wurden als FAME analysiert (C.1.3.1.).

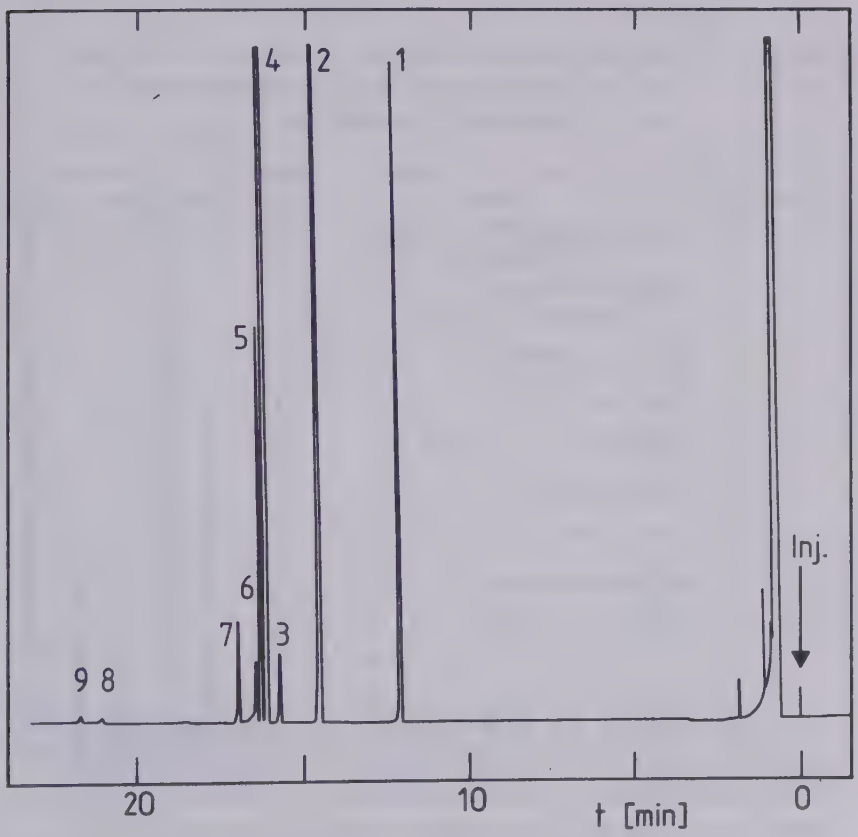


Abb. 7. Typisches Gaschromatogramm der FAME aus Oenotherensamenölen. Nach dem Lösungsmittelpeak folgen die Fettsäuren:

(1) Palmitinsäure
(2) Heptadecansäure, interner Standard
(3) γ-Linolensäure
(4) Linolsäure
(5) Ölsäure
(6) Vaceensäure
(7) Stearinsäure
(8) Eicosadiensäure
(9) Arachinsäure

Inj. = Zeitpunkt der Einspritzung

Die in den Gaschromatogrammen auftretenden Peaks wurden sowohl massenspektrometrisch als auch durch den Vergleich der Retentionszeiten mit denen bekannter FAME-Referenzen identifiziert. In Tabelle 8 sind die in allen Oenotherensamenölen vorkommenden Fettsäuren und deren Molekülionenpeaks (M) ihrer Massenspektren aufgelistet. Die Peak-Nummern beziehen sich auf die Peaks des Gaschromatogramms der Abb. 7.

Tabelle 8. FAME aus Oenotherensamenölen
M = Molekülionenpeak der FAME-Massenspektren
m/e = Ionenmasse/Ionenenergie

Peak	FAME	M bei m/e
1	Palmitinsäure (16 : 0)	270
2	Heptadecansäure (17 : 0), interner Standard	
3	γ-Linolensäure (18 : 3 n-6)	292
4	Linolsäure (18 : 2 n-6)	294
5	Ölsäure (18 : 1 n-9)	296
6	Vaceensäure (18 : 1 n-7)	296
7	Stearinsäure (18 : 0)	298
8	Eicosadiensäure (20 : 2)	322
9	Arachinsäure (20 : 0)	326

Die Massenspektren der FAME dienten hauptsächlich zur Aufklärung des Molekülionenpeaks und des Desaturierungsgrades der entsprechenden Fettsäuren. Anhand der charakteristischen Retentionszeiten der FAME konnten dann gaschromatographisch die Doppelbindungsstellen von Fettsäureisomeren (z. B. Ölsäure und Vaceensäure) bestimmt werden.

In den folgenden Abb. 8 - 15 sind die Massenspektren der identifizierten FAME aus Oenotherensamenölen in der Reihenfolge, wie sie im Gaschromatogramm erscheinen, dargestellt.

Am Beispiel des Methylesters der Palmitinsäure (Abb. 8) soll zunächst ein charakteristisches Fragmentierungsmuster der Massenspektren von FAME erläutert werden (DRUCKER und VEAZEY, 1977):

- Molekülionenpeak M bei m/e 270
- Verlust einer Methoxy-Gruppe: M - 31 ⟶ 239
- Verlust einer Acetyl-Gruppe: M - 43 ⟶ 227
- Verlust der CH_2-Gruppen: 227 - 14 ⟶ 213,
  dann 199 - 185 - 171 - 157 - 143 - 129 - etc.
- Basispeak bei m/e 74

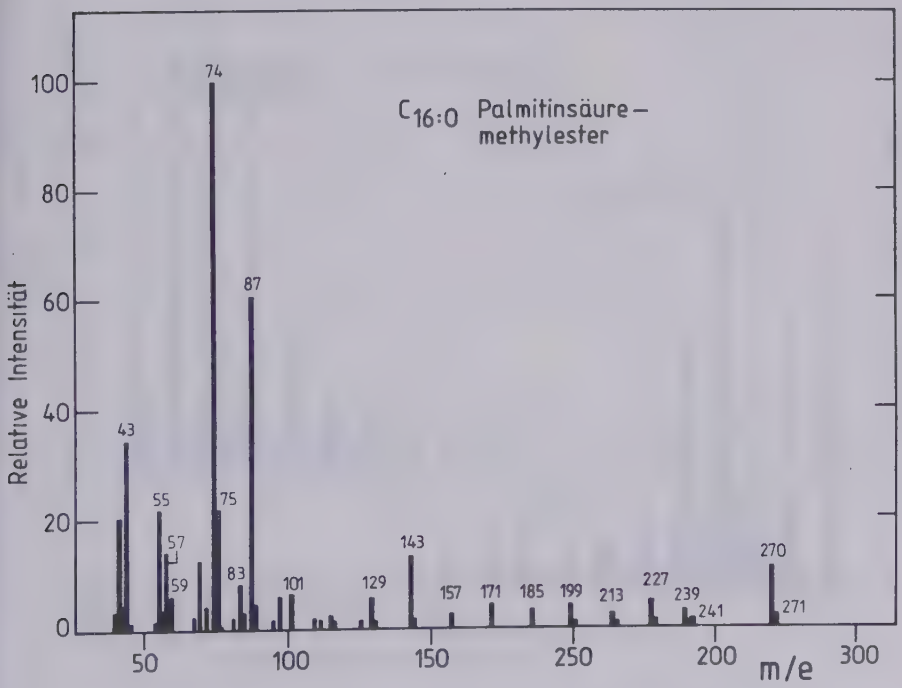


Abb. 8. Massenspektrum des Methylesters der Palmitinsäure (16 : 0); m/e = Ionenmasse/Ionenenergie Molekülionenpeak bei m/e 270

In den folgenden Abbildungen sind die Massenspektren der Methylester der γ -Linolensäure (Abb. 9), der Linolsäure (Abb. 10), der Ölsäure (Abb. 11), der Vaceensäure (Abb. 12), der Stearinsäure (Abb. 13), der Eicosadiensäure (Abb. 14) sowie der Arachinsäure (Abb. 15) wiedergegeben.

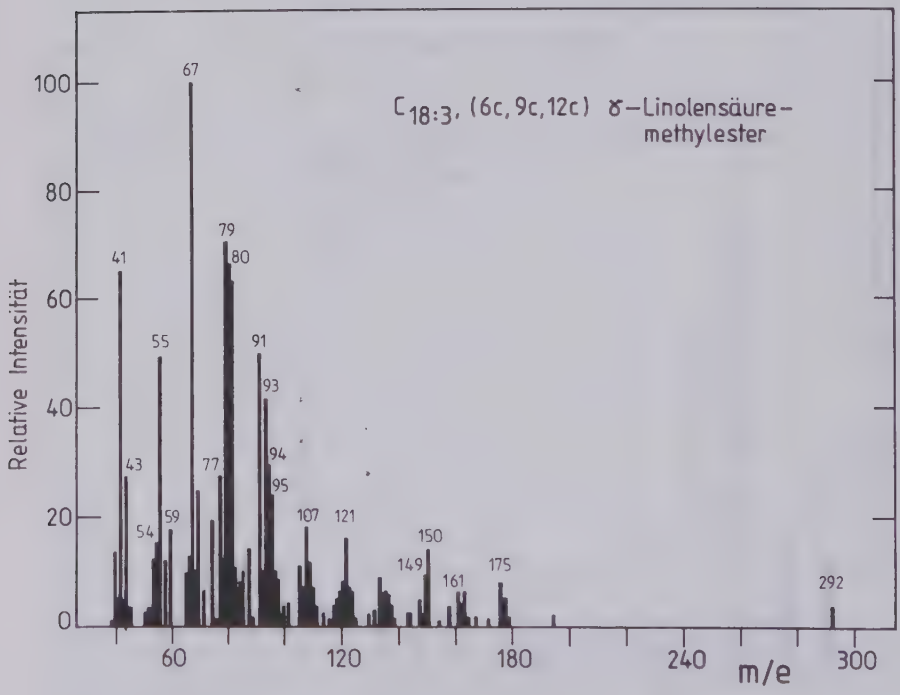


Abb. 9. Massenspektrum des Methylesters der γ -Linolensäure (18 : 3 n-6).
6c, 9c, 12c: cis-Doppelbindungsstellen
Molekülionenpeak bei m/e 292

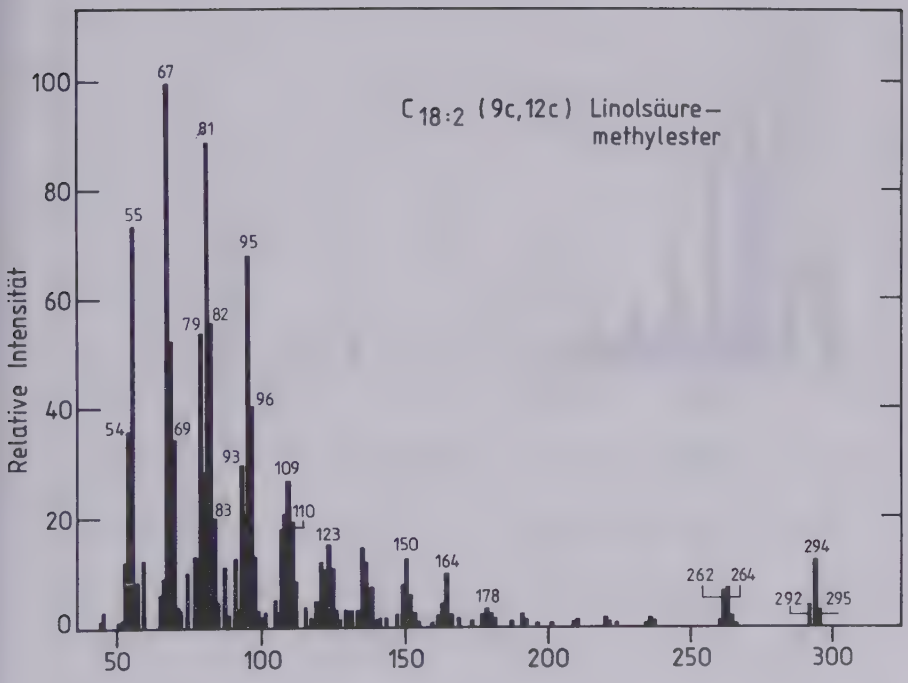


Abb. 10. Massenspektrum des Methylesters der Linolsäure (18 : 2 n-6).
9c, 12c: cis-Doppelbindungsstellen
Molekülionenpeak bei m/e 294

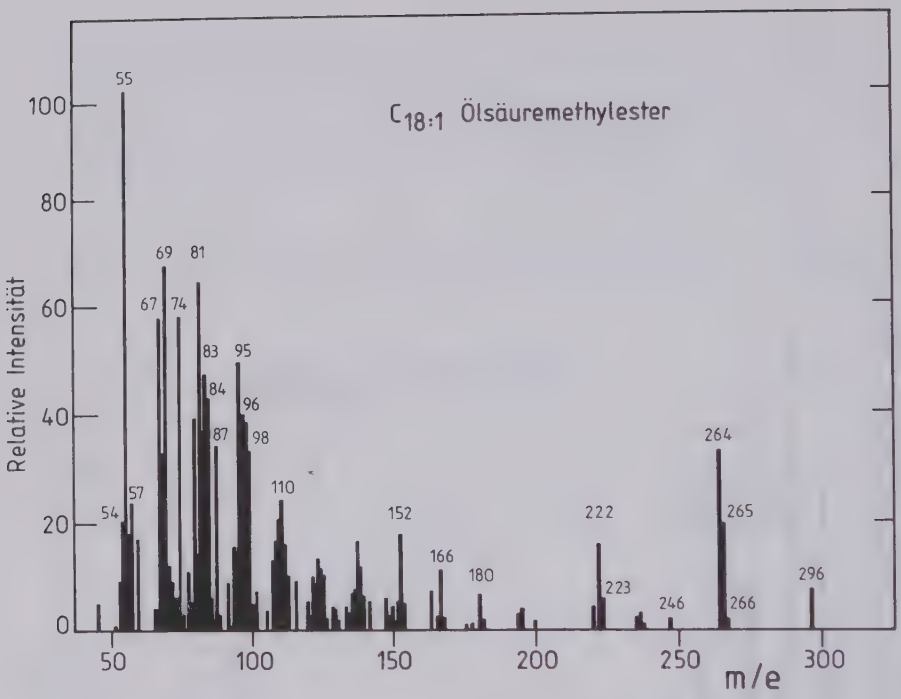


Abb. 11. Massenspektrum des Methylesters von 18 : 1 n-9.

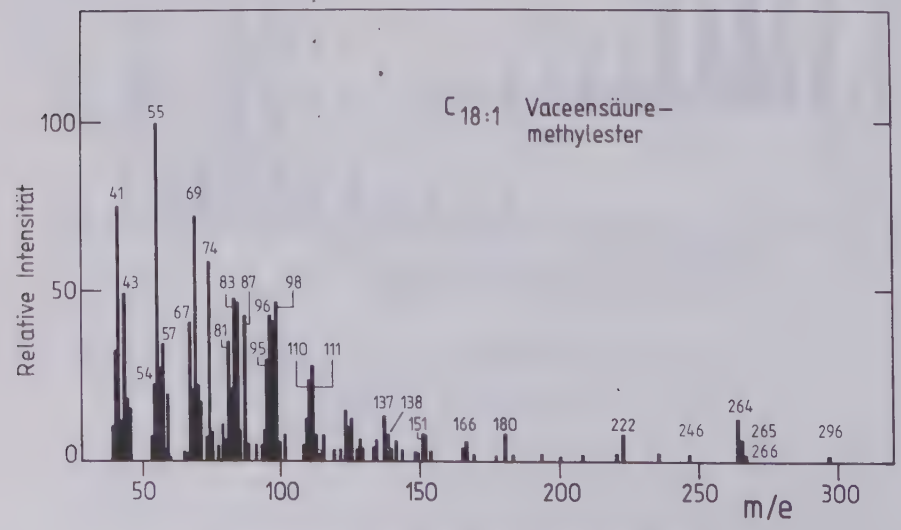


Abb. 12. Massenspektrum des Methylesters von 18 : 1 n-7.

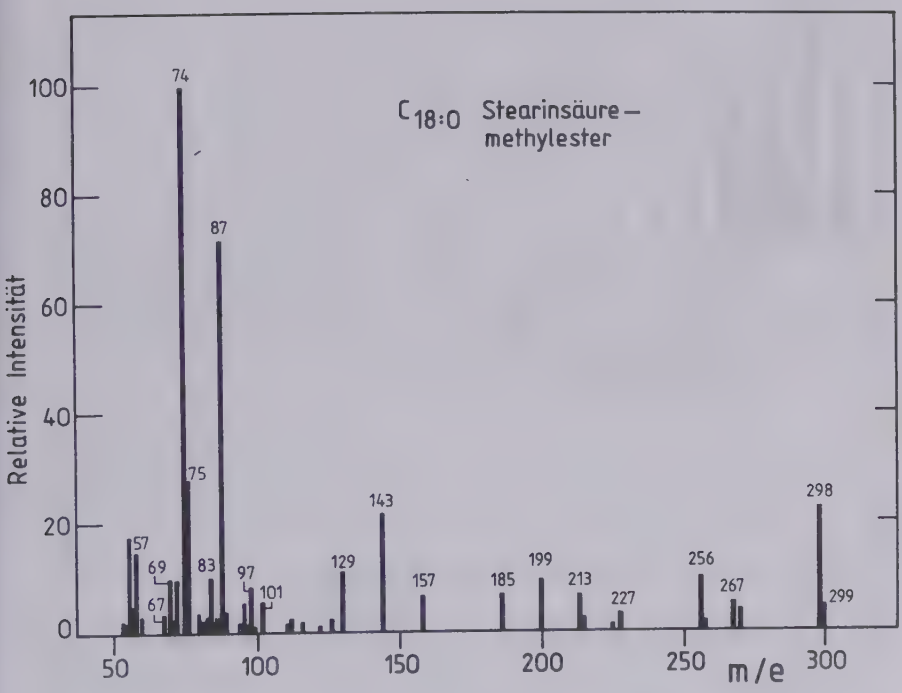


Abb. 13. Massenspektrum des Methylesters der Stearinsäure (18 : 0).
Molekülionenpeak bei m/e 298

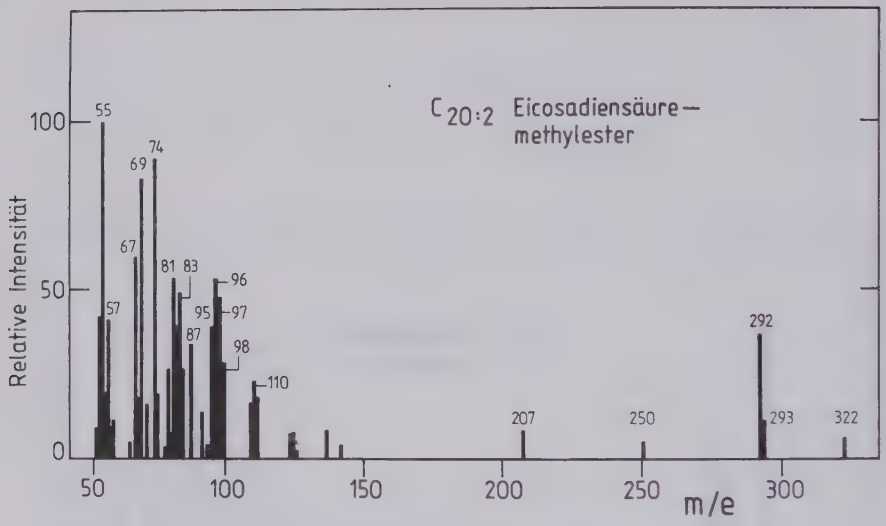


Abb. 14. Massenspektrum des Methylesters der Eicosadiensäure (20 : 2).
Molekülionenpeak bei m/e 322

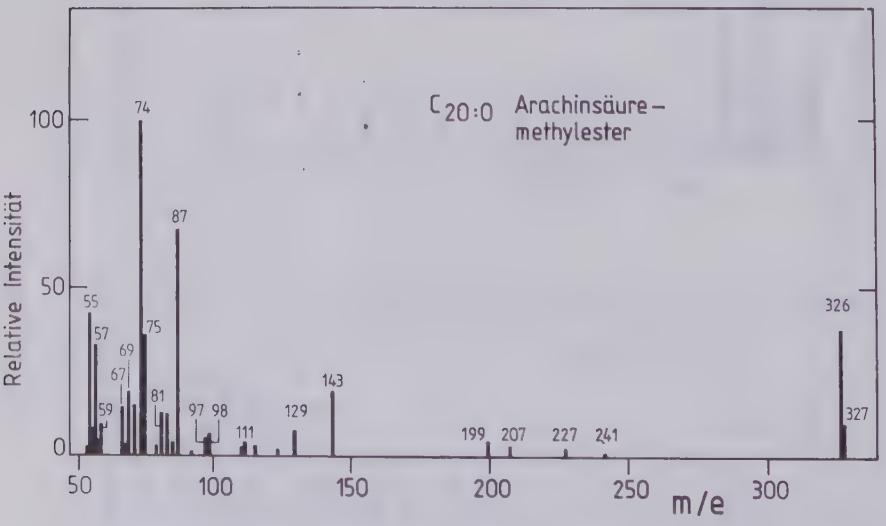


Abb. 15. Massenspektrum des Methylesters der Arachinsäure (20 : 0).
Molekülionenpeak bei m/e 326

C.2.2. Quantitative Analyse der Fettsäuren aus Samenölen

Zur quantitativen Analyse der FAME aus Samenölen wurden gaschromatographisch die Responsefaktoren der Fettsäuren nach C.1.3.3. in Relation zu 17 : 0 bestimmt. In Tab. 9 sind die RRF-Werte der einzelnen FAME aufgelistet.

Tabelle 9. RRF-Werte der FAME in bezug auf 17 : 0. (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 12 separaten Eichstandardanalysen)
Für 18 : 1 n-7 wurden die Werte von 18 : 1 n-9 eingesetzt.

FAME	RRF-Wert
Palmitinsäure (16 : 0)	1,17 ± 0,008
Stearinsäure (18 : 0)	1,17 ± 0,012
Ölsäure (18 : 1 n-9)	1,16 ± 0,011
Vaceensäure (18 : 1 n-7)	1,16 ± 0,011
Linolsäure (18 : 2 n-6)	1,00 ± 0,010
γ-Linolensäure (18 : 3 n-6)	0,96 ± 0,006

Auf die Bestimmung der RRF-Werte von Eicosadiensäure (20 : 2) und Arachinsäure (20 : 0) wurde verzichtet, da diese nur in Spuren (< 0,5 %) in Oenotherensamenölen auftreten und nicht für quantitative Vergleiche geeignet sind.

C.2.3. Der Samenölgehalt von Oenotheren

Die Samen der verschiedenen Oenotherenformen wurden zunächst auf ihren Gesamtlipidgehalt hin untersucht. Aus Tabelle 10 geht deutlich hervor, daß bei identischem Kerngenom jeweils die Oenotherenformen mit berteriana-Plasmon einen höheren Samenölgehalt im Vergleich zu den Hybriden mit odorata-Plasmon aufweisen.

Tabelle 10. Samenölgehalt (Gesamt-FAME/g TG) der verschiedenen Oenotherenformen des Jahrgangs 1973 (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je sechs unabhängigen Samenölextraktionen).

Genomkomplexe	Plasmon	Samenölgehalt (%)
v · I	berteriana	23,66 ± 0,15
v · I	odorata	21,71 ± 0,46
B · I	berteriana	17,87 ± 1,25
B · I	odorata	13,73 ± 0,51
l · v	berteriana	23,30 ± 0,79
l · v	odorata	20,83 ± 0,29
B · v	berteriana	22,13 ± 0,45
B · v	odorata	17,00 ± 0,25

Der Einfluß des Plasmons auf den Samenölgehalt zeigt sich reproduzierbar auch für Samen, die aus anderen Jahrgängen stammen. Für das Hybridpaar mit den Genomkomplexen B und v wurden Samen der Selbstung des Jahres 1980 analysiert (Tab. 11), die Lipidbestimmung für die Hybridpaare mit B · I- und l · v-Genomkomplexen wurde mit Samen des Jahrgangs 1983 durchgeführt (Tab. 12). In allen Fällen produzierten auch hier bei identischem Genom die Oenotherenformen mit berteriana-Plasmon mehr Samenöl als die entsprechenden Formen mit odorata-Plasmon.

Tabelle 11. Samenölgehalt (Gesamt-FAME/g TG) der Oenotherenformen mit den Genomkomplexen B und v. Die Samen stammen aus der Selbstung des Jahres 1980. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Extraktionen.

Genomkomplexe	Plasmon	Samenölgehalt (%)
B · v	berteriana	24,09 ± 0,25
B · v	odorata	19,86 ± 0,50

Tabelle 12. Samenölgehalt (Gesamt-FAME/g TG) der Hybridpaare mit den Genomkomplexen B · I und 1 · v. Die Samen stammen aus den Selbstungen des Jahres 1983. (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je sechs unabhängigen Samenölextraktionen)

Genomkomplexe	Plasmon	Samenölgehalt (%)
B · I	berteriana	15,33 ± 0,16
B · I	odorata	9,69 ± 0,19
1 · v	berteriana	23,64 ± 0,63
1 · v	odorata	20,92 ± 0,25

Vergleicht man den Samenölgehalt der Hybriden aus Samen verschiedener Jahrgänge, so zeigt sich, daß die Akkumulation von Triglyceriden durch exogene Faktoren beeinflußt werden kann. Die Hybriden mit den Genomkomplexen B und I produzierten im Jahrgang 1973 (Tab. 10) mehr Samenöle als 1983. Die Samen der B · v-Formen hingegen weisen im Jahrgang 1980 einen höheren Lipidgehalt (Tab. 11) als im Jahrgang 1973 auf (Tab. 10). Die 1 · v-Hybriden zeigen keine quantitativen Unterschiede im Ölgehalt ihrer Samen aus den Jahren 1973 und 1983 (Tab. 10 und Tab. 12).

Die Analysen des Samenölgehaltes zweijähriger Oenotherenformen (Tab. 13) demonstrieren, daß die Samen von Oenothera biennis und der beiden Oenothera lamarckiana-Mutanten ähnliche Mengen an Triglyceriden im Vergleich zu den Oenotherenhybriden speichern.

Tabelle 13. Samenölgehalt (Gesamt-FAME/g TG) von Oenothera biennis L. und Oenothera lamarckiana de VRIES mut. blandina und mut. erythrosepala (Jahrgang 1983). Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Samenölanalysen.

Oenotherenformen	Samenölgehalt (%)
Oenothera biennis L.	16,30 ± 0,29
Oenothera lamarckiana mut. blandina	21,25 ± 0,24
Oenothera lamarckiana mut. erythrosepala	13,17 ± 0,44

Der Einfluß des Kerngenoms auf die Produktion von Triglyceriden in Samen ließ sich mit Oenotherenhybriden untersuchen, die bei identischem Plasmon mit unterschiedlichen Genomkomplexen ausgestattet sind (Abb. 16 und Abb. 17). Für diese Fragestellung wurden alle verfügbaren Oenotherenformen auf ihren Samenölgehalt hin analysiert.

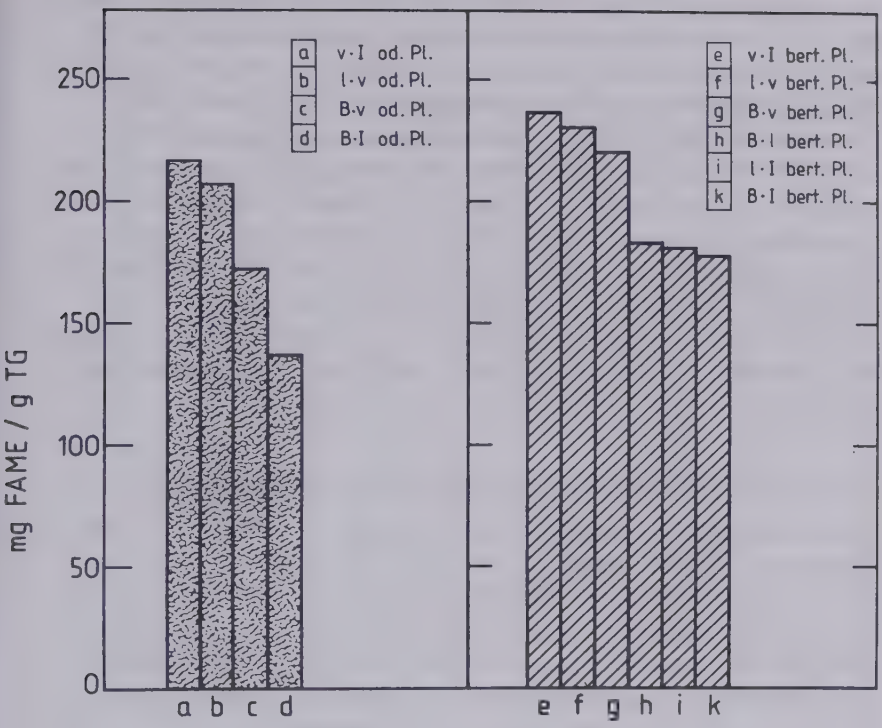


Abb. 16

Abb. 17

Abb. 16. Samenölgehalt (mg Gesamt-FAME/g TG) der Oenotherenformen mit unterschiedlichen Genomkomplexen und jeweils odorata-Plasmon (Samen aus den Selbstungen des Jahres 1973).

Abb. 17. Samenölgehalt (mg Gesamt-FAME/g TG) der Oenotherenformen mit unterschiedlichen Genomkomplexen und jeweils berteriana-Plasmon (Samen aus den Selbstungen des Jahres 1973).
Die Standardabweichungen betragen nur 1 - 5 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs Analysen) und wurden deshalb graphisch nicht dargestellt.

Die Analysen der Samenlipide lassen deutlich erkennen, daß die Oenotherenformen mit den Genomkomplexen v und I sowohl in Kombination mit berteriana- als auch mit odorata-Plasmon den höchsten Samenölgehalt aufweisen. Die B · I-Hybriden hingegen akkumulieren bei beiden Plasmonkombinationen die geringsten Samenölmengen. Offensichtlich besitzt der v-Genomkomplex einen wesentlich stärkeren Einfluß auf die Triglyceridsynthese als der B-Genomkomplex. Auch die Effekte der anderen Genomkomplexe l und I sind stärker als die des B-Genomkomplexes. Bei Samen, die einen v-Genomkomplex haben, ist eine Abnahme im Samenölgehalt von v · I- über l · v- zu den B · v-Formen festzustellen; dies gilt für beide Plasmonkombinationen.

C.2.4. Die Fettsäurezusammensetzung der Oenotherensamen

Die Fettsäurezusammensetzung der Samenöle ist bei allen untersuchten Oenotherenformen sehr ähnlich (Tab. 14). Mit einem Anteil von 80,6 % - 83,3 % tritt Linolsäure (18 : 2 n-6) als Hauptkomponente in den Triglyceriden auf. In geringerem Maße werden außerdem Palmitinsäure (8,3 - 9,5 %), Ölsäure (4,1 - 6,0 %), Stearinsäure (1,4 - 2,2 %), γ-Linolensäure (1,0 - 2,6 %) und Spuren (< 1 %) von Vaceensäure, Arachin- und Eicosadiensäure in die Samentriglyceride eingebaut.

Tabelle 14. Die Fettsäurezusammensetzung der Samenöle von Oenotheren (Samen des Jahrgangs 1973). (20 : 0 und 20 : 2 mit < 0,2 % am Gesamlipidgehalt waren für vergleichende Analysen nicht geeignet.) Die Standardabweichung liegt bei max. 3 % des jeweils aus sechs Analysen angegebenen Mittelwertes.

Genom-komplexe	Plasmon	Fettsäuren (Gewichts-% der Gesamt-FAME)					
		16:0	18:0	18:1 n-9	18:1 n-11	18:2 n-6	18:3 n-6
v · I	bert.	8,98	1,72	5,92	0,67	80,64	2,04
v · I	od.	8,54	1,39	4,83	0,80	83,34	1,06
B · I	bert.	8,61	1,55	4,76	0,66	81,81	2,58
B · I	od.	8,68	1,35	4,12	0,85	82,94	2,03
l · v	bert.	9,48	2,25	6,00	0,40	80,86	0,99
l · v	od.	8,74	1,82	5,64	0,45	80,87	2,46
B · v	bert.	8,29	1,40	4,54	0,72	82,92	2,10
B · v	od.	8,60	1,52	5,53	0,80	81,76	1,74

Die nur geringen Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Samenöle weisen darauf hin, daß in erster Linie die Chromosomengene die Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride kontrollieren. In Hybriden mit identischen Genomen ist daher der höhere Samenölgehalt der Formen mit berteriana-Plasmon auf höhere Quantitäten jeder einzelnen Fettsäure zurückzuführen. Dies veranschaulicht Abb. 18.

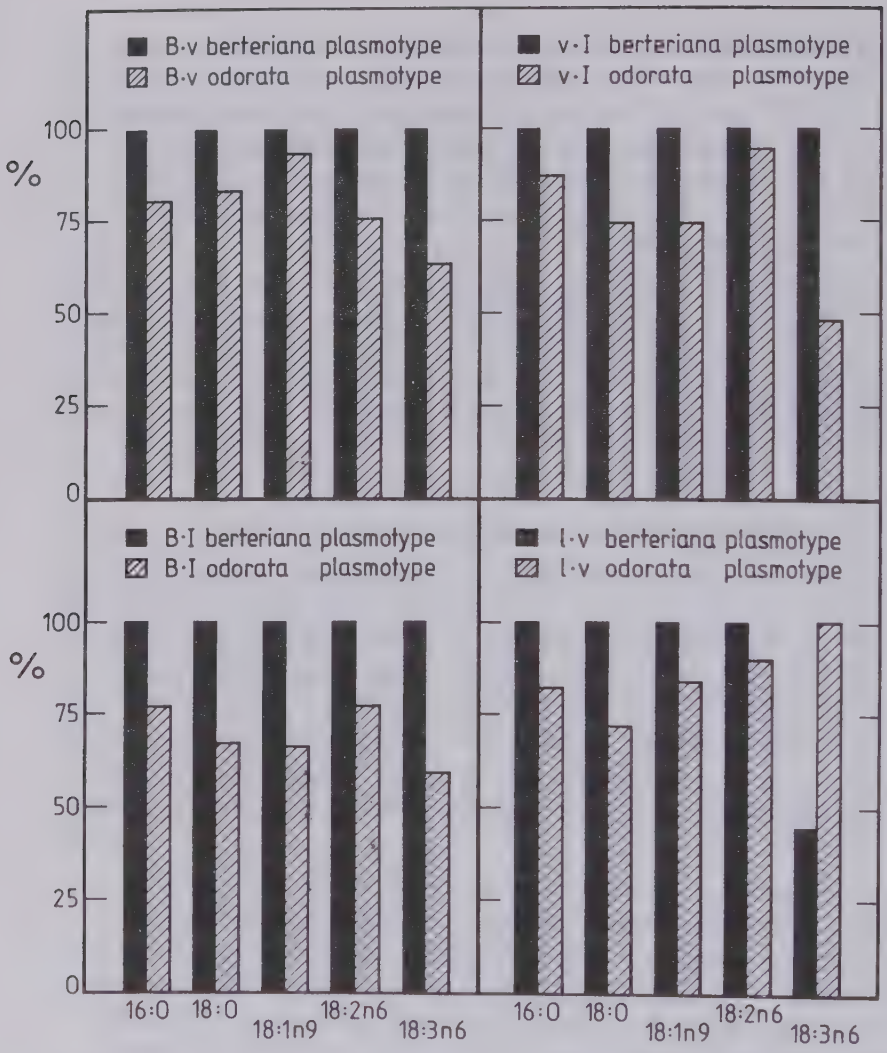


Abb. 18. Quantitative Unterschiede im Fettsäuregehalt der Samenöle von Oenotheren (Samen von Selbstungen des Jahres 1973). Der höhere Wert der FAME von Formen mit berteriana-Plasmon wurde 100 % gesetzt (Ausnahme bei 18 : 3 n-6 der l · v-Hybriden). Die Standardabweichung liegt bei nur 1 - 5 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs Analysen) und wurde graphisch nicht dargestellt.

Innerhalb eines Hybridpaares mit identischen Genomkomplexen weisen jeweils die Formen mit berteriana-Plasmon höhere Quantitäten an Fettsäuren auf, wobei je nach Komponente die Hybriden mit odorata-Plasmon zwischen 10 % , jedoch meist über 20 % weniger Fettsäuren akkumulieren. Im Falle der γ-Linolensäure sind diese Unterschiede besonders deutlich. Bei den B · v-, v · I- und B · I-Formen produzieren die Samen mit berteriana-Plasmon zwischen 40 % und 50 % mehr γ-Linolensäure gegenüber den Formen mit odorata-Plasmon. In Hybriden mit 1 · v-Genomkomplexen hingegen sind die Verhältnisse gerade umgekehrt: Hier weist die Form mit odorata-Plasmon doppelt so hohe Mengen an γ-Linolensäure auf (Abb. 18). Dieser spezielle Fall ist auch reproduzierbar für Samen des Jahrgangs 1983 (Abb. 19): Während bei den B · I-Formen wie im Jahrgang 1973 die Samen mit berteriana-Plasmon einen höheren γ-Linolensäuregehalt haben, akkumulieren bei 1 · v-Hybriden wiederum die Samen mit berteriana-Plasmon 50 % weniger γ-Linolensäure. In beiden Jahrgängen zeigen auch die quantitativen Unterschiede aller anderen Fettsäuren für beide Hybridpaare fast identische Werte.

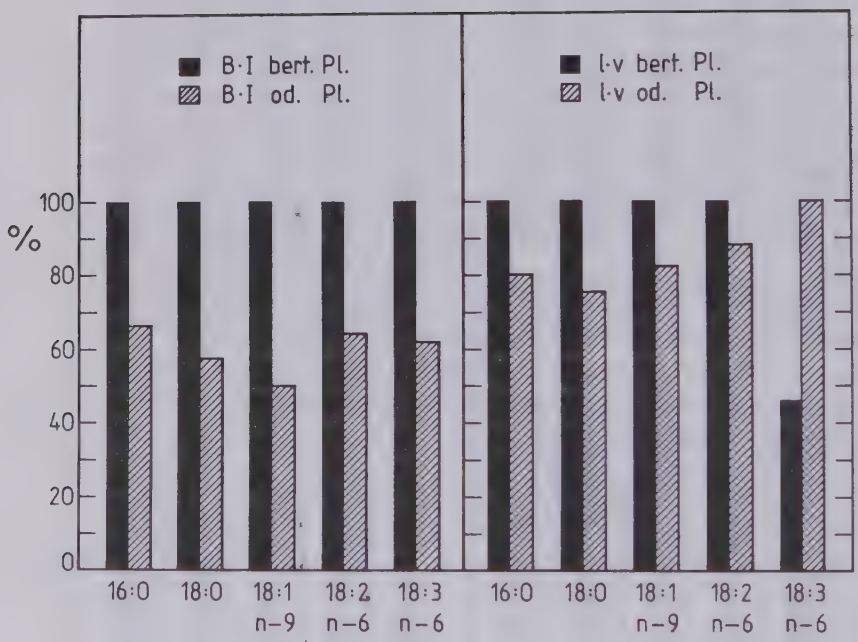


Abb. 19. Quantitative Unterschiede im Fettsäuregehalt der Samenöle von Oenotheren (Samen des Jahrgangs 1983). Der höhere Wert der FAME von Formen mit berteriana-Plasmon wurde 100 % gesetzt (Ausnahme bei 18 : 3 n-6 der l · v-Hybriden). Die Standardabweichung liegt bei 1 - 5 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs Analysen) und wurde graphisch nicht dargestellt.

Die Fettsäurezusammensetzung der therapeutisch wirksamen Samenöle zweijähriger Oenotherenformen (Oe. biennis und Oe. lamarckiana) weist gegenüber den einjährigen Oenotherenhybriden charakteristische Unterschiede auf (Tab. 15).

Tabelle 15. Die Fettsäurezusammensetzung von Samenölen der zweijährigen Oenotherenformen Oe. biennis L., Oe. lamarckiana de VRIES mut. blandina und mut. erythrosepala (Samen des Jahrgangs 1983). Die Standardabweichung liegt bei max. 3 % des jeweils aus je sechs Analysen angegebenen Mittelwertes.

Oenotherenform	Fettsäurezusammensetzung (Gewichts-% der Gesamt-FAME)					
	16:0	18:0	18:1 n-9	18:1 n-11	18:2 n-6	18:3 n-6
Oe. biennis L.	5,06	1,19	8,55	0,53	74,88	9,76
Oe. lamarckiana mut. blandina	5,09	1,27	5,82	0,48	77,93	9,38
Oe. lamarckiana mut. erythropala	6,56	1,35	8,24	0,65	71,04	12,13

Besonders zu betonen ist der wesentlich höhere Gehalt an der pharmazeutisch wertvollen γ-Linolensäure in den Samenölen der zweijährigen Oenotheren (9,38 - 12,13 % gegenüber 1,0 - 2,6 % bei einjährigen Oenotheren, Tab. 14). Dies hat zur Folge, daß der prozentuale Anteil an Linolsäure als direkte Vorstufe zur γ-Linolensäure in Triglyceriden der zweijährigen Oenotheren geringer ist (71,04 - 77,93 % gegenüber 80,64 - 83,34 % bei einjährigen Oenotherenformen). Generell haben die Samen der Oe. biennis und der Oe. lamarckiana-Mutanten auch einen niedrigeren Gehalt an gesättigten Fettsäuren (16 : 0 und 18 : 0, vgl. Tab. 14 und Tab. 15).

C.3. Diskussion

C.3.1. Zur Methodik

Für die Bestimmung der Fettsäuren aus Oenotherensamenölen wurde ein sowohl qualitativ wie auch qualitativ reproduzierbares Gaschromatographie-Analysenverfahren entwickelt. Die Fettsäuremethylesterpräparation nach der Methode von BADINGS und DE JONG (1083), die ursprünglich für die Analyse von Milchfetten ausgearbeitet worden war, konnte erfolgreich für Samenöluntersuchungen angewandt werden. Gegenüber der Diazomethanolyse(z.B. ROPER und MA, 1957), der BF_3-MeOH-Veresterung (MORRISON und SMITH, 1964) oder Techniken der basisch-katalysierten Veresterung von Fettsäuren (METCALFE et al., 1966, SHEPARD und IVERSON, 1975) bringt die direkte Transmethylierung mit Natriummethanolat entscheidende Vorteile in puncto präziser quantitativer Umsetzung, Zeitersparnis (keine Hydrolyseprozeduren) und Ungiftigkeit.

Die gaschromatographische Trennung der FAME über die unpolare Kapillarsäule "SE 54" erwies sich als geeignete Methode, wobei jedoch zu beachten ist, daß mit dieser Phase zwar γ-Linolensäure, aber nicht α-Linolensäure von Ölsäure trennbar ist. Da Triglyceride von Oenotherensamen γ-Linolensäure und Ölsäure, aber keine α-Linolensäure aufweisen, konnten die Samenöluntersuchungen mit der schon für Zimt- und Phenolcarbonsäureanalysen verwendeten "SE 54"-Kapillarsäule durchgeführt werden. Für FAME-Analysen von Membranlipiden, die allgemein α-Linolen- und Ölsäure enthalten, oder auch für Samenlipidanalysen anderer Pflanzen jedoch müssen polarere Säulen (z. B. Carbowax-, Superox-, Silarphasen) verwendet werden.

C.3.2. Der Einfluß der Kerngenome und des Plasmons auf den Gehalt und die Fettsäurezusammensetzung der Oenotherensamenöle

Die aus Analysen der Samenöle von Oenotheren gewonnenen Ergebnisse demonstrieren deutlich, daß die außerkaryotische Konstitution einen entscheidenden Einfluß auf die Akkumulation von Triglyceriden besitzt: Bei allen untersuchten Oenotherenformen mit identischem Kerngenom (Tab. 10) weisen jeweils die Hybriden mit berteriana-Plasmon einen 10 % (bei v · I- und l · v-Formen) bis 25 % (bei B · I- und B · v-Formen) höherén Samenölgehalt gegenüber den entsprechenden Hybriden mit odorata-Plasmon auf. Dieser gerichtete Einfluß des berteriana-Plasmons ließ sich auch für Lipide aus Samen anderer Jahrgänge reproduzierbar aufzeigen (Tab. 11 und Tab. 12). Die unterschiedlichen Lipidgehalte der Samen verschiedener Jahrgänge weisen jedoch zugleich darauf hin, daß die Produktion von Samenölen auch von exogenen Faktoren beeinflußt werden kann. Der Effekt von Temperatur und Klima auf die Akkumulation von Samenlipiden wurde schon für Oenothera biennis L. (LOTTI et al., 1978), aber auch z. B. für Soja- und Sonnenblumensamen (SILVER et al., 1984, CHERRY et al., 1985) nachgewiesen. Es ist aber festzuhalten, daß trotz der Variationen im Samenölgehalt unterschiedlicher Jahrgänge der Plasmoneinfluß immer gleichgerichtet wirkt.

Der Einfluß der Kerngenom-Komplexe auf die Synthese von Samenlipiden konnte durch Analysen mit Oenotherenformen, die bei identischem Plasmon mit unterschiedlichen Genomkomplexen ausgestattet sind, aufgeklärt werden. Die Ergebnisse (Abb. 16 und Abb. 17) demonstrieren, daß sowohl in Kombination mit berteriana- als auch mit odorata-Plasmon der v-Genomkomplex den stärksten, der B-Genomkomplex hingegen den geringsten Einfluß auf die Synthese von Samenölen besitzt. Die Effekte der Genomkomplexe l und I liegen zwischen den beiden Extremen und sind in ihrer Wirksamkeit sehr ähnlich. Somit ist der Einfluß der Genomkomplexe auf den Gehalt an Samenölen durch die Reihenfolge v — l/I — B gekennzeichnet. Dies sollte bei weiteren Analysen, z. B. auf enzymatischer Basis,

berücksichtigt werden. In Abhängigkeit von der Genomkomplexkombination wirken die Plasmone unterschiedlich stark modifizierend auf den Lipidgehalt der Samen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Triglyceridsynthese über spezifische Kerngenom-Plasmon-Interaktionen gesteuert wird.

Die Fettsäurezusammensetzung der Samenöle ist bei allen untersuchten Oenotherenformen sehr ähnlich (Tab. 14) und wird vom Plasmon nur geringfügig beeinflußt. Damit kontrolliert in erster Linie die genetische Konstitution der Chromosomengene die Fettsäurezusammensetzung in reifen Samen. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen an anderen Samenölen (DOWNEY und HARVEY, 1963, HILL und KNOWLES, 1968, KNOWLES, 1968). So wurden z. B. für die Steuerung der Anteile an Linol- und Ölsäure in reifen Saflorsamen (STUMPF, 1975) drei Allele auf einem Chromosomenlocus gefunden. DOWNEY (1964) konnte eine direkte Kontrolle des Genotyps über das Kettenverlängerungssystem zur Bildung von Erucasäure aus Ölsäure in Rapssamen nachweisen.

Bei der Steuerung der Fettsäurezusammensetzung wirken alle Genomkomplexe gleichmäßig. Der verstärkte Einfluß des v-Genomkomplexes sowie der schwächere Einfluß des B-Genomkomplexes auf die Triglyceridsynthese manifestiert sich daher nur in einem unterschiedlich hohen Gesamtölgehalt (Unterschiede bis max. 25 %). Das Plasmon kann ebenfalls Unterschiede bis zu 25 % bewirken, so daß die Effekte des Plasmons in derselben Größenordnung wie die des Kerngenoms liegen! Dies hebt besonders deutlich den hohen Einfluß der extrachromosomalen Konstitution bei der Triglyceridsynthese hervor.

Im allgemeinen wird die Fettsäurezusammensetzung der Samenöle in nur geringem Maße vom Plasmon modifiziert. Für den Gehalt an γ-Linolensäure jedoch ist ein drastischer Einfluß des Plasmons festzustellen: Bei den v · I-, B · I- und B · v-Formen in Kombination mit berteriana-Plasmon liegt der prozentuale Anteil an γ-Linolensäure um 50 - 100 % höher als bei den entsprechenden Formen mit odorata-Plasmon (vgl. Tab. 14). Bei den Hybriden mit den Genomkomplexen 1 und v

sind die genannten Verhältnisse gerade umgekehrt. Dies weist eindeutig darauf hin, daß für die Regulation des speziellen Desaturierungsschritts von 18 : 2 n-6 zur 18 : 3 n-6 über die Δ 6-Desaturase spezifische Kerngenom-Plasmon-Interaktionen verantwortlich sind.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besitzen die Samenöle der Oenothera biennis und Oenothera lamarckiana aufgrund ihres hohen Gehaltes (10 %) an γ-Linolensäure therapeutische Wirksamkeit, was in zahlreichen klinischen Versuchen überprüft wurde (z. B. CUNNANE et al., 1984; HORROBIN und MANKU, 1983; SCHÖLKENS et al., 1983; KUNKEL et al., 1981). Die Samenöle der einjährigen Oenotheren wurden mit denen von Oenothera biennis L. und Oenothera lamarckiana verglichen, vor allem, da die einjährigen Nachtkerzen gegenüber den zweijährigen Formen den Vorteil haben, jedes Jahr ausreichend Samen liefern zu können. Die Analysen ergaben, daß zwar der Samenölgehalt bei ein- und zweijährigen Oenotheren sehr ähnlich ist, aber die zweijährigen Nachtkerzen einen 4 -5fach höheren Gehalt an pharmazeutisch wirksamer γ-Linolensäure aufweisen. Somit sind die Samenöle der einjährigen Oenotherenformen für therapeutische Zwecke offensichtlich weniger interessant.

Da die Produktion von γ-Linolensäure stark vom Plasmon beeinflußt wird, ergibt sich vom genetischen Standpunkt aus betrachtet ein wichtiger angewandter Aspekt: Durch die Wahl eines geeigneten Plasmons (und damit eines geeigneten mütterlichen Elters) könnte der Gehalt an γ-Linolensäure in Samen zweijähriger Oenotheren noch erhöht werden. Da das Plasmon generell auch einen starken Einfluß auf den Gesamtölgehalt besitzt, könnte sich übertragen auf die Züchtung anderer wichtiger Ölpflanzen die Auslese eines günstigen mütterlichen Elters auch auf eine Steigerung des Ölertrages positiv auswirken.

D. Analyse der Blattlipide

D.1. Material und Methoden

D.1.1. Versuchspflanzen

Zur Analyse der Blattlipide wurde gefriergetrocknetes Blattmaterial verwendet, das aus der Anzucht von Pflanzen zur Extraktion der Zimt- und Phenolcarbonsäuren stammt (vgl. B.1.1. und B.1.2., S. 5). Die Lipidzusammensetzung der Blätter wurde an zwei Hybridpaaren (Tab. 16) untersucht, die im Langtag in einer Klimakammer unter identischen Bedingungen aufwuchsen (vgl. Programm der Klimakammer, S. 6).

Tabelle 16. Genetische Konstitution der untersuchten Oenotherenformen

Chromosomenkomplexe	Chondriom	Plastom
B · I	berteriana	berteriana
B · I	odorata	odorata
l · v	berteriana	berteriana
l · v	odorata	odorata

D.1.2. Extraktion und Reinigung der Blattlipide

Die Extraktion der Blattlipide aus Oenotheren erfolgte wie bei den Samenölen in einer Soxhlett-Apparatur.

Einwaage in die Extraktionshülse:	0,50 g gefriergetrocknetes, pulverisiertes Blattmaterial
Extraktionsmittel:	210 ml $CHCl_3$-MeOH
Extraktionsdauer:	14 h unter N_2-Zufuhr als Oxidationsschutz

Die Blattlipidextrakte, die neben Pigmenten alle Neutralen Lipide (NL), Glykolipide (GL) und Phospholipide (PL) enthalten, wurden im Rotationsverdampfer konzentriert, unter Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und zur nachfolgenden Aufreinigung in 5 ml $CHCl_3$-MeOH (2 : 1) aufgenommen.

Die Reinigung des Lipidrohextraktes von nicht-lipidischen Kontaminationen wurde nach dem hierfür etablierten FOLCH-Verfahren erzielt (FOLCH, 1957). Der Reinigungsschritt ist bei einem Lipidverlust von maximal 0,3 % sehr gut für quantitative Analysen geeignet.

Der Rohextrakt (in 5 ml $CHCl_3$-MeOH, 2 : 1) wird in ein Sovirel-Kulturröhrchen (Nutzvolumen 8 ml) einpipettiert, mit 1 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung versetzt und 1 min. lang mit dem Vortex-Mixer kräftig geschüttelt. Nach der Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min. bilden sich zwei Phasen aus. Die milchige Oberphase mit den Kontaminationen wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und die Interphase 3 x mit 1 ml der 0,9% NaCl-Lösung nachgespült, ohne die Chloroform-MeOH-Unterphase zu zerstören. Die gereinigte Unterphase, die Pigmente und Blattlipide enthält, wird als Ausgangslösung für die anschließende Lipidfraktionierung verwendet.

D.1.3. Lipidfraktionierung über Säulenchromatographie

Die Fraktionierung der Blattlipide in Neutrale Lipide, Glyko- und Phospholipide erfolgte über Kieselgelsäulenchromatographie, wobei die einzelnen Fraktionen durch zunehmend polarer werdende Lösungsmittel eluiert werden. Die Methoden der Lipidfraktionierung nach ROUSER et al. (1967) und BARROW et al. (1983) wurden hierzu miteinander kombiniert. Nach Überprüfung der Reinheit der Fraktionen (vgl. D.1.5.) war eine leichte Modifizierung der Lösungsmittelpolaritäten zur quantitativen Elution der Neutralen Lipide und der Glykolipide erforderlich. Die Säulenpräparation wurde nach KATES (1972) durchgeführt.

Daten zur Säulenchromatographie:

Glassäule:	40 cm x 2 cm
Packung:	20 g Kieselgel 60, Korngröße 0,063-0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM für die Säulenchromatographie) wird kurz vor Gebrauch bei 120° C im Trockenschrank für 2 h voraktiviert und zur Packung in 100 ml Hexan-Essigester (1 : 1) suspendiert.
Länge der Kieselgelsäule nach der Packung:	15,5 cm
Elutionsmittel:	a) 300 ml Hexan-Essigester (1 : 1) zur Elution der Neutralen Lipide b) 500 ml Aceton, dann 500 ml Aceton-MeOH (9 : 1) zur Elution der Glykolipide c) 300 ml MeOH zur Elution der Phospholipide
Flußrate:	3 ml/min.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer konzentriert und unter Stickstoff-Strom getrocknet. Zur Quantifizierung und Kontrolle der weiteren Aufarbeitungsschritte werden die Eluate in 10 ml Chloroform-MeOH (2 : 1)-Lösung aufgenommen, die entsprechend den Lipidkonzentrationen als internen Standard Heptadecansäuremethylester (17 : 0) enthält:

Neutrale Lipide:	Aufnahme in 10 ml einer 0,005 % Standardlösung
Glykolipide:	Aufnahme in 10 ml einer 0,05 % Standardlösung
Phospholipide:	Aufnahme in 10 ml einer 0,01 % Standardlösung

Aus diesen Stammlösungen wurde jeweils ein Aliquot (1 - 2 ml) zur Charakterisierung der Lipidklassen über Dünnschichtchromatographie und zur gaschromatographischen Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Fraktionen verwendet.

D.1.4. Charakterisierung der Lipidfraktionen über Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung der Lipidfraktionen in ihre individuellen Komponenten erfolgte über ein- bzw. zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Für alle DC-Analysen wurden Kieselgelfertigplätten (10 x 20 cm, Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm, Merck) verwendet, die unmittelbar vor Gebrauch im Trockenschrank bei 120° C für 2 h voraktiviert wurden.

Charakterisierung der Neutralen Lipide

Ein Aliquot (1 - 2 ml) der Neutrale Lipid-Stammlösung (vgl. D.1.3.) wurde unter Stickstoff-Strom konzentriert, mit einer Kapillare auf die DC-Platte aufgetragen und in folgendem Fließsystem entwickelt:

Diethylether - Petrolether (SP. 60° C) - Ameisensäure 15 : 85 : 1 (v/v/v) nach SAFFORD et al. (1975).

Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten wurden zusätzlich Lipidreferenzen (Roth) auf die Platte aufgetragen:

- Heptadecansäuremethylester (17 : 0)
- Ölsäure (18 : 1)
- Triglyceride aus Oenotherensamenöl
- Sterolmix aus Cholesterol, Stigmasterol und Sitosterol

Als Nachweisreagenz für Sterole und ungesättigte Lipide diente H_2SO_4 konz. - Eisessig (1 : 1) (JATZKEWITZ und MEHL, 1960). Nach Besprühen der Platten und anschließendem Erhitzen auf 120° C für 15 min. erschienen die Sterole als rote Spots auf weißem Hintergrund, ungesättigte Lipide entwickelten leicht rosa-braune Flecken.

Charakterisierung der Glykolipide

Die Glykolipide wurden über das Fließmittelsystem Chloroform - MeOH - 25 % Ammoniak (60 : 25 : 4, v/v/v) nach NICHOLS (1964) in ihre individuellen Komponenten aufgetrennt. Hierzu wird 1 ml der Glykolipidstammlösung (D.1.3.) konzentriert aufgetragen. Die Identifizierung der Glykolipide erfolgte durch den Vergleich mit den Referenz-Glykolipiden (Supelco):

- Monogalaktosylglycerid (MGDG)
- Digalaktosylglycerid (DGDG)
- Sterylglycosid (SG)
- Sterylglycosid-Ester (ESG)
- Cerebrosid (Cer)

Zur Detektion der Glykolipide wurde ein selbsthergestelltes α-Naphthol-Sprühreagenz (SIAKOTOS und ROUSER, 1965) verwendet. Nach anschließendem Besprühen der Platten mit H_2SO_4 konz. - H_2O dest. (95 : 5, v/v) und Erhitzen auf 120° C für 10 min. erschienen die Glykolipide als blau-lila bis lachsbraune Spots.

Charakterisierung der Phospholipide

Die Auftrennung der Phospholipide erfolgte über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (OSAGIE und KATES, 1984). Hierzu werden 2 ml der Phospholipidstammlösung konzentriert aufgetragen und in Fließmittelsystem 1 (Chloroform - MeOH - H_2O dest., 65 : 25 : 4, v/v/v) entwickelt. Vor Einstellen der Platten in die Küvette mit Fließmittelsystem 2 (Chloroform - MeOH - 25 % Ammoniak, 65 : 35 : 5, v/v/v) werden zur Identifizierung folgende Referenz-Phospholipide (Sigma, Supelco) auf der Startlinie für die 2. Dimension aufgetragen:

- Phosphatidyl-Inositol (PI)
- Phosphatidyl-Serin (PS)
- Phosphatidyl-Cholin (PC)
- Phosphatidyl-Ethanolamin (PE)
- Phosphatidyl-Glycerin (PG)
- Phosphatidsäure (PA)
- Cardiolipin = Diphosphatidylglycerin (CL)

- Lysophosphatidyl-Ethanolamin (LPE)
- Lysophosphatidyl-Serin (LPS)
- Lysophosphatidyl-Cholin (LPC)
- Lysophosphatidyl-Glycerin (LPG)

Zur Detektion der Phospholipide wird das hochspezifische Phosphatspray nach VASKOWSKY und KOSTETSKY (1968) verwendet. Nach Besprühen der Platten erschienen die Phospholipide sofort als blaue Spots. Aminolipide wie LPS, PS, LPE und PE sind zusätzlich mit Ninhydrinspray (Merck) spezifisch nachweisbar; sie sind 5 - 10 min. nach dem Besprühen an ihrer Violettfärbung zu erkennnen.

D.1.5. Prüfung der Reinheit der Lipidfraktionen über Dünnschichtchromatographie

Nach jedem Säulenlauf wurden die Lipidfraktionen auf ihre Reinheit und jeweils quantitative Eluierung hin geprüft. Hierzu wurden folgende Testansätze durchgeführt:

- Neutrale Lipidfraktion: Test auf Kontamination durch Glykolipide mit Glykolipidnachweisreagenz
- Glykolipidfraktion: Test auf Kontamination durch Phospholipide oder Neutrale Lipide mit Phosphatspray und Neutral-Lipid-Nachweisreagenz
- Phospholipidfraktion: Test auf Kontamination durch Glykolipide mit Glykolipidnachweisreagenz

D.1.6. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren aus Blattlipiden

D.1.6.1. Methylierung der Fettsäuren

Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in den einzelnen Lipidfraktionen über Gaschromatographie wurden die Neutralen Lipide, die Glyko- und Phospholipide direkt transmethyliert, wobei die exzellente Methode der Transmethylierung von Triglyceriden nach BADINGS und DE JONG (1983) erfolgreich auf Glyko- und Phospholipide übertragen werden konnte (vgl. C.1.3.1.).

Hierzu werden von der Stammlösung der NL und PL 2 ml, von der GL-Stammlösung 1 ml entnommen (D.1.3.), jeweils in ein Sovirel-Kulturröhrchen einpipettiert und unter Stickstoff-Strom getrocknet. Nach Zugabe von 0,5 ml getrocknetem MeOH und 0,5 ml n-Heptan werden die Lipide mit je 100 µl 2 N $NaOCH_3$ (im Überschuß) transmethyliert. Zur quantitativen Umsetzung müssen die Proben 2 min. kräftig auf einem Vortex-Mixer geschüttelt werden. Nach Zentrifugation bei 2500 rpm für 10 min. bildet sich ein Zweiphasensystem, wobei in der Heptanoberphase die FAME gelöst sind, während in der MeOH-Unterphase Natriumglycerat aus Triglyceriden der NL-Proben, Glycosylnatriumglycerat aus den GL-Proben bzw. Phosphatidylnatriumglycerat bei PL-Proben zurück bleibt. Die klare Oberphase mit den FAME wird vorsichtig abgenommen und kann nun über Gaschromatographie auf ihre FAME-Zusammensetzung hin untersucht werden.

D.1.6.2. Analysendaten der KGC

Zur Analytik der FAME-Zusammensetzung der Blattlipide war die unpolare Kapillarsäule "SE 54" ungeeignet, da Ölsäure und α-Linolensäure nicht voneinander getrennt werden konnten.

Die Trennung der FAME erfolgte über eine Quarzkapillare mit der polaren stationären Phase "Superox". Im Gegensatz zu unpolaren Säulen erscheinen hier die ungesättigten Fettsäuren mit zunehmendem Desaturierungsgrad hinter den entsprechenden gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge im Gaschromatogramm. Nachfolgend werden nur die gegenüber B.1.5.2., S. 9, veränderten Analysendaten aufgelistet.

- Quarzkapillare (Fused Silica)

Länge:	25 m
innerer Durchmesser:	0,2 mm
stationäre Phase:	Superox (Polyethylenglycol MW 4 Mio.) polar
Filmdicke der stat. Phase:	0,2 µm
Betriebstemperatur:	60° C - 240° C

- Temperaturprogramm:	150° C - 220° C
	Heizrate 4° C/min.
Injektortemperatur:	230° C
Detektortemperatur:	230° C
- Injektionsmenge	0,5 µl

D.1.6.3. Qualitative und quantitative Analyse der FAME

Die qualitative Analyse der FAME aus den einzelnen Lipidfraktionen wurde wie bei den Samenölen über Massenspektrometrie (vgl. C.1.3.3., S. 30) durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung diente der in den Stammlösungen (D.1.3.) der NL, GL und PL entsprechend eingewogene interne Standard Heptadecansäuremethylester (17 : 0). Die Quantifizierung in mg erfolgte wiederum unter Berücksichtigung der FAME zu 17 : 0 in der jeweiligen Probe sowie der RRF-Werte der einzelnen Fettsäuren.

Einwaage von 17 : 0 in	bei NL: 0,5 mg
den Proben	bei GL: 5,0 mg
	bei PL: 1,0 mg

Die Analysendaten wurden nach B.1.5.5. statistisch ausgewertet.

D.2. Ergebnisse

D.2.1. Lipidfraktionierung über Säulenchromatographie

Nach der Lipidfraktionierung der Blattlipide über Säulenchromatographie in ihre drei Unterklassen NL, GL und PL wurde jede Fraktion über Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit nach Testansatz D.1.5. überprüft. Hierbei stellte sich heraus, daß die in der Literatur übliche Elution der Glykolipide mit reinem Aceton (KATES, 1972) nicht zu quantitativen Ergebnissen führte. Ein Teil des DGDG war in den PL-Fraktionen zu finden. Nach Modifikation des Glykolipidsäulenlaufes mit Aceton - MeOH (9 : 1) wurde eine quantitative Elution des DGDG ohne Kontamination mit Phospholipiden erzielt. Zur optimalen Eluierung der NL und PL mußten die vorgegebenen Lösungsmittelvolumina von 200 ml (KATES, 1972) auf 300 ml erhöht werden. Diese verbesserte Lipidfraktionierungsmethode ermöglichte eine hervorragende quantitative Ausbeute an Lipiden aus Blättern aller untersuchten Oenotherenformen.

D.2.2. Analyse der NL, GL und PL aus Blattlipiden von Oenotheren über Dünnschichtchromatographie

D.2.2.1. Charakterisierung der NL

Die NL-Fraktion aus Blattlipiden von Oenotheren wurde nach D.1.4. in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. Dies veranschaulicht Abb. 20.

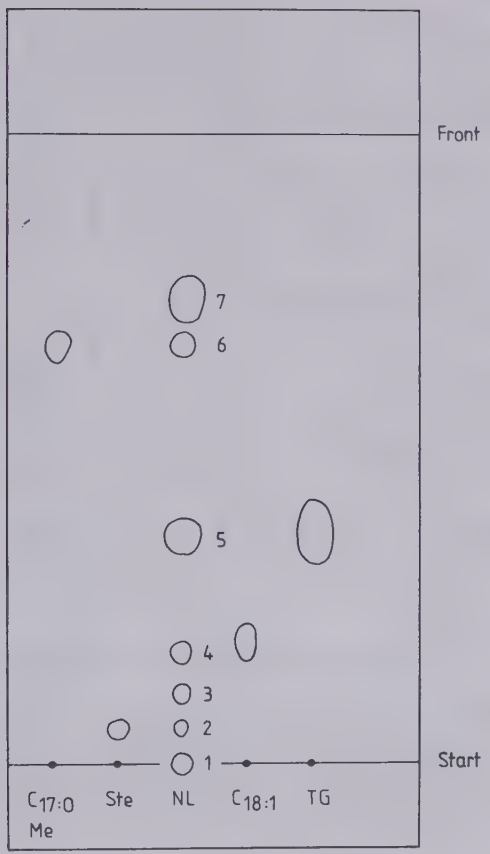


Abb. 20. Dünnschichtchromatogramm der NL. Die Auftrennung der Einzelkomponenten erfolgte über Fließmittelsystem Diethylether - Petrolether, 60° C - Eisessig (15 : 85 : 1, v/v/v).
Detektion mit H_2SO_4 konz. - Eisessig (1 : 1)
Spots:
(1) Pigmente
(2) Sterole (Ste)
(3) freie Fettsäure
(4) freie Fettsäure (18 : 1)
(5) Triglycerid (TG)
(6) FAME (17 : 0)
(7) Sterolester

Die Neutralen Lipide ließen sich in sieben Einzelkomponenten auftrennen und sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17. Spot-Nr., Rf-Werte und Farbentwicklung der identifizierten Einzelkomponenten aus NL der Blattlipide von Oenotheren

Spot-Nr.	NL-Komponente	Rf-Wert	Färbung bei Detektion
1	Pigmente (Chlorophyll, Carotinoide)	0	
2	Sterole (Ste)	0,06	rot-braun
3	freie Fettsäure	0,10	rosa-braun
4	freie Fettsäure (18 : 1)	0,17	rosa-braun
5	Triglycerid (TG)	0,36	braun
6	FAME ($C_{17\ :\ 0}$-Me)	0,66	hellbraun
7	Sterolester	0,74	rot-braun

Spot Nr. 7 konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da eine Sterolester-Referenz nicht zur Verfügung stand. Jedoch deutet die kräftige rot-braune Farbentwicklung und der relative Rf-Wert der Substanz (vgl. SAFFORD et al., 1975) auf einen Sterolester hin.

D.2.2.2. Charakterisierung der GL

Eine Auftrennung der Glykolipide in ihre individuellen Komponenten wurde nach D.1.5.2. erzielt. Neben den quantitativ dominierenden Glykolipiden DGDG, MGDG und Sulfolipid (SL, wahrscheinlich Sulfoquinovosyldiglycerid, SQD) konnten ein Sterylglycosid (SG) und ein Cerebrosid (Cer) identifiziert werden (vgl. Abb. 21).

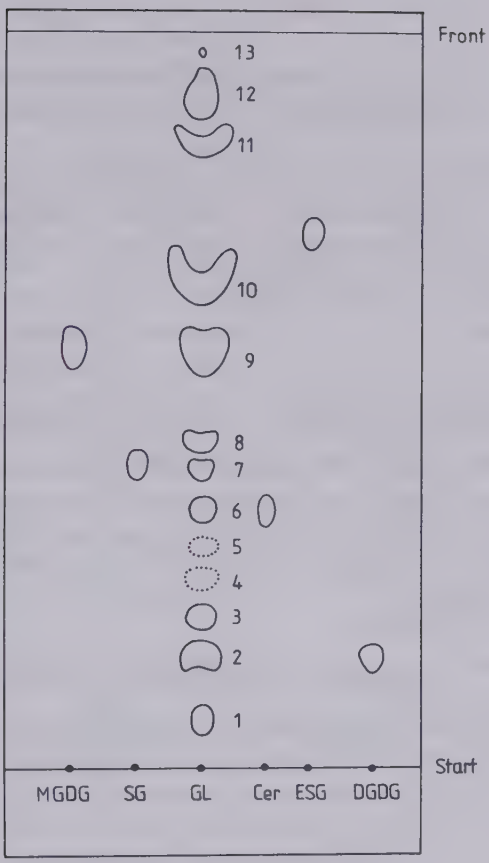


Abb. 21. Dünnschichtchromatogramm der GL. Die Auftrennung erfolgte über Fließmittelsystem Chloroform - MeOH - 25 % Ammoniak (60 : 25 : 4, v/v/v).
Detektion über α-Naphthol und H_2SO_4 konz. - H_2O dest. (95 : 5, v/v).
Spots:

(1) nicht identifiziert	(6) Cerebrosid (Cer)
(2) DGDG	(7) Sterylglycosid
(3) SL	(8) Pigment
(4) nicht identifiziert	(9) MGDG
(5) nicht identifiziert	(10) - (13) Pigmente

ESG = Sterylglycosidester

In Tabelle 18 sind die Rf-Werte der Glykolipidkomponenten, der Pigmente und drei weiterer nicht identifizierter Substanzen sowie deren Farbentwicklung bei der Detektion aufgelistet.

Tabelle 18. Rf-Werte der Glykolipidkomponenten sowie die Farbentwicklung der Spots bei der Detektion

Spot-Nr.	GL-Komponente	Rf-Wert	Farbentwicklung bei Detektion
1	nicht identifiziert, kein NL, GL oder PL	0,06	gelb
2	DGDG	0,15	blau-lila
3	SL	0,20	lachsfarben
4	nicht identifiziert	0,25	schwach lila
5	nicht identifiziert	0,29	schwach lila
6	Cerebrosid (Cer)	0,34	lila
7	Sterylglycosid (SG)	0,40	lila
8	Pigment (Chlorophyll)	0,44	
9	MGDG	0,58	blau-lila
10 - 13	Pigmente		

Spot Nr. 1 ergab bei der Detektion eine starke Gelbfärbung. Es handelt sich hierbei um eine polare Substanz, die aber nach den Detektionsverfahren für NL und PL keine entsprechende Farbreaktion zeigte und somit keine Verunreinigung aus NL oder PL darstellen kann.

Spot Nr. 3 konnte nur nach seinem relativen Rf-Wert (vgl. NICHOLS, 1964) als Sulfolipid, wahrscheinlich das in Glykolipidfraktionen häufig zu findende Sulfoquinovosyldiglycerid (SQD) identifiziert werden. Ein Vergleich des Rf-Wertes mit der entsprechenden SL-Referenz war nicht möglich, da das Sulfolipid nicht käuflich zu erwerben ist.

Spot Nr. 4 und Spot Nr. 5 waren ebenfalls nicht identifizierbar. Beide Substanzen gehören aufgrund ihrer Lilafärbung der Glykolipidklasse an, jedoch sind neben den schon erwähnten Glykolipiden außer einem Sterylglycosidester keine weiteren Komponenten für Glykolipide in der Literatur beschrieben. Daß es sich bei einer der beiden Substanzen nicht um diesen Sterylglycosidester (ESG) handeln kann, zeigt der wesentlich höhere Rf-Wert der ESG-Referenz im Dünnschichtchromatogramm der Glykolipide (Abb. 21). Möglicherweise sind Spot Nr. 4 und 5 Glykolipidvorstufen.

D.2.2.3. Charakterisierung der Phospholipide

Die Phospholipide wurden über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nach D.1.4. in die Lysophospholipide LPE, LPC und LPG, in die Aminolipide PS und PE sowie die Komponenten PI, PG, PC und CL aufgetrennt. Die Identifizierung der Spots erfolgte über die Rf-Werte der Referenzsubstanzen, die jeweils eindimensional in beiden Fließmitteln entwickelt wurden. In Abb. 22 ist ein typisches Dünnschichchromatogramm der Phospholipide dargestellt; vor Einstellen der Platten in die Küvette mit Fließmittel 2 (s. Abb. 22) wurden alle Referenzen auf die Startlinie für die 2. Dimension aufgetragen.

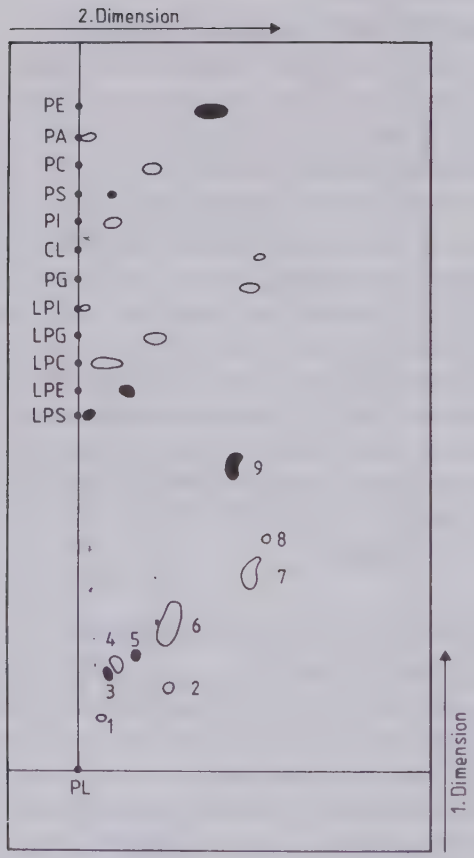


Abb. 22. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der PL. 1. Dimension / Fließmittel 1: Chloroform - MeOH - H_2O dest. (65 : 25 : 4, v/v/v). 2. Dimension / Fließmittel 2: Chloroform - MeOH - 25 % Ammoniak (65 : 35 : 5, v/v/v). Detektion mit Phosphatspray und Ninhydrinspray. Spots: (1) LPC, (2) LPG, (3) PS, (4) PI, (5) LPE, (6) PC, (7) PG, (8) CL und (9) PE.

Abb. 23 veranschaulicht die Entwicklung der Referenzsubstanzen in der 1. Dimension mit Fließmittel 1.

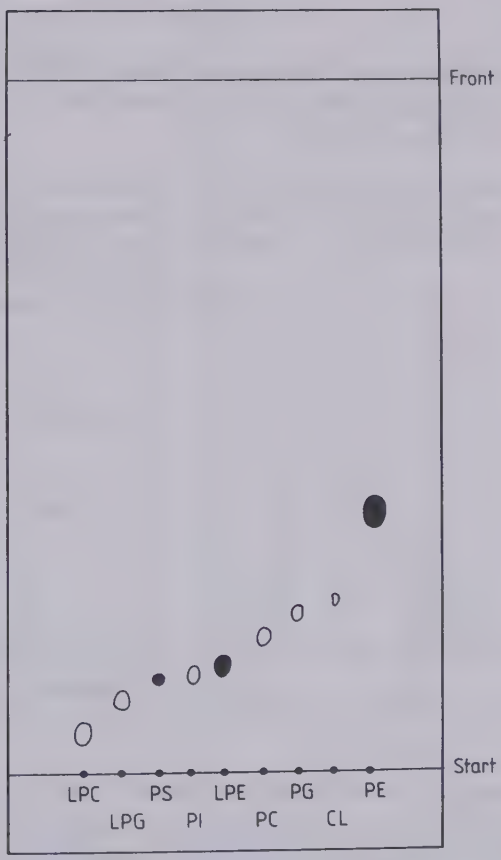


Abb. 23. Eindimensionales Dünnschichtchromatogramm der Phospholipidreferenzen, entwickelt in der 1. Dimension mit Fließmittelsystem 1 (Chloroform - MeOH - H_2O dest., 65 : 25 : 4, v/v/v). Detektion mit Phosphat- und Ninhydrinspray.

Neben den Rf-Werten der Referenzsubstanzen (vgl. Tab. 19) war die Detektion der Aminolipide mit einem Ninhydrinspray von großer Hilfe; vor allem die nur schwer zu trennenden Phospholipide PI und PS konnten aufgrund der ninhydrinpositiven Farbreaktion des PS eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 19. Rf-Werte der Phospholipidkomponenten sowie deren Farbentwicklung bei der Detektion mit Ninhydrin- und Phosphatspray

PL-Komponente	Rf-Wert 1. Dimension	Rf-Wert 2. Dimension	Farbentwicklung nach Detektion mit Ninhydrinspray	Phosphatspray
LPC	0,06	0,10	-	blau
LPG	0,10	0,27	-	blau
PS	0,13	0,12	violett	blau
PI	0,14	0,13	-	blau
LPE	0,16	0,17	violett	blau
PC	0,20	0,28	-	blau
PG	0,23	0,58	-	blau
CL	0,25	0,62	-	blau
PE	0,38	0,44	violett	blau

D.2.3. Qualitative Analyse der Fettsäuren aus NL, GL und PL über GC/MS

Die drei Lipidfraktionen NL, GL und PL wurden gaschromatographisch (Analysendaten D.1.6.2.) auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht. Die folgenden Abb. 24, 25 und 26 zeigen typische Gaschromatogramme der drei Lipidfraktionen aus Blattlipiden von Oenotheren; die Fettsäuren wurden als Methylester analysiert (D.1.6.1.).

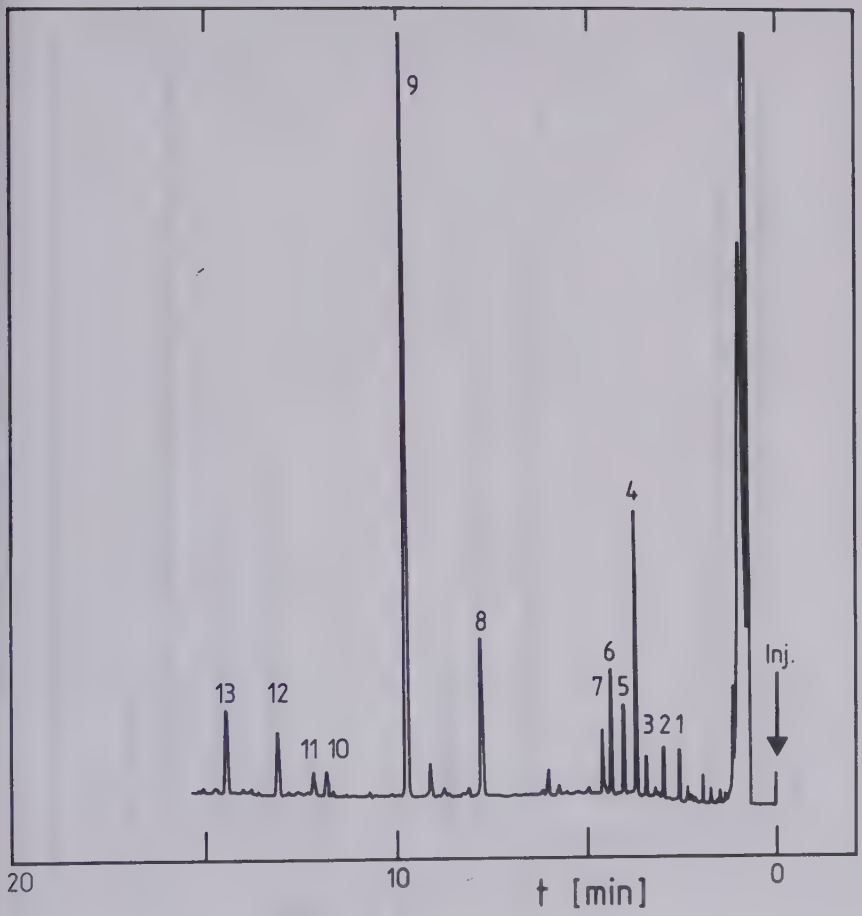


Abb. 24. Typisches Gaschromatogramm der FAME aus NL der Blätter von Oenotheren. Nach dem Lösungsmittelpeak und den Kohlenwasserstoffen (1 - 7) folgen die Fettsäuren:

(8) Palmitinsäure (16 : 0)
(9) Heptadecansäure, interner Standard (17 : 0)
(10) Stearinsäure (18 : 0)
(11) Ölsäure (18 : 1 n-9)
(12) Linolsäure (18 : 2 n-6)
(13) α-Linolensäure (18 : 3 n-3)

Inj. = Zeitpunkt der Einspritzung

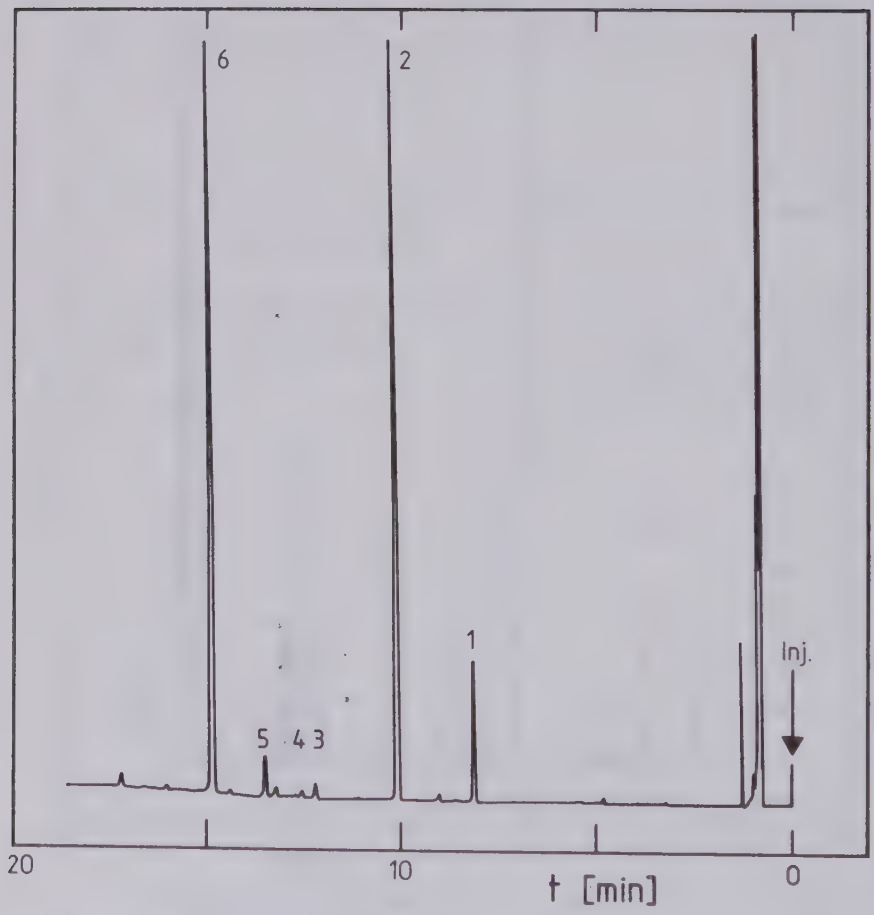


Abb. 25. Typisches Gaschromatogramm der FAME aus GL der Blätter von Oenotheren. Nach dem Lösungsmittelpeak folgen die Fettsäuren:

(1) Palmitinsäure (16 : 0)
(2) Heptadecansäure, interner Standard (17 : 0)
(3) Stearinsäure (18 : 0)
(4) Ölsäure (18 : 2 n-9)
(5) Linolsäure (18 : 2 n-6)
(6) ∝-Linolensäure (18 : 3 n-3)

Inj. = Zeitpunkt der Einspritzung

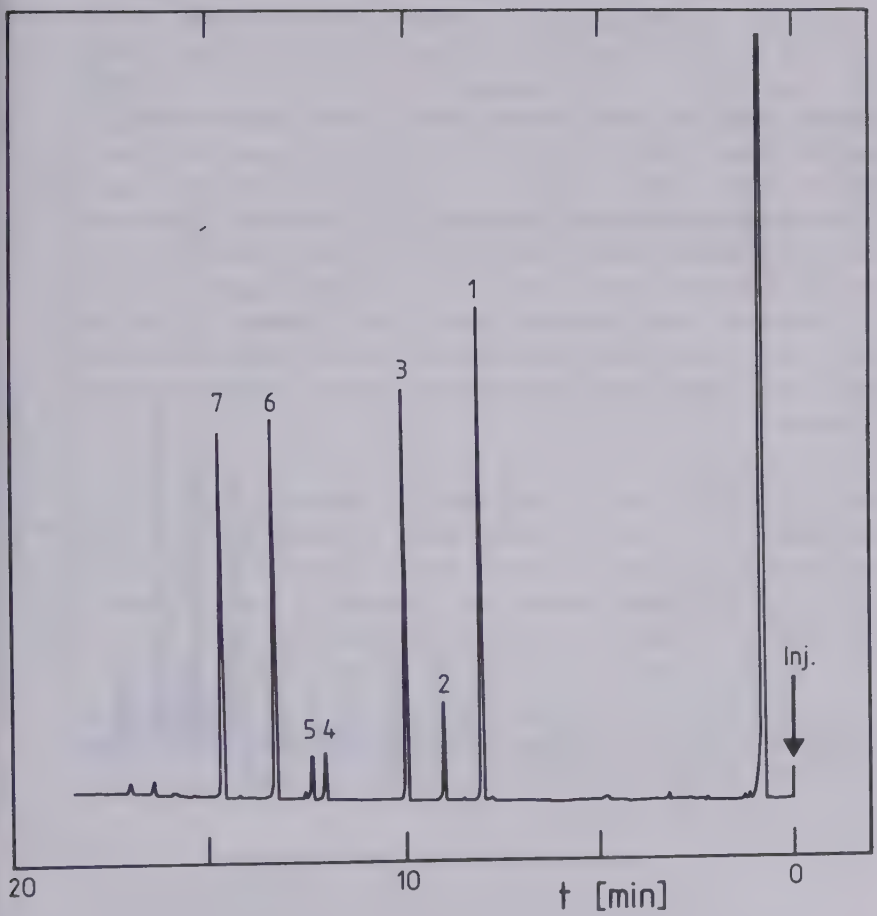


Abb. 26. Typisches Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus PL von Oenotheren. Nach dem Lösungsmittelpeak folgen die Fettsäuren:

(1) Palmitinsäure (16 : 0)
(2) Hexadecensäure (16 : 1)
(3) Heptadecansäure, interner Standard (17 : 0)
(4) Stearinsäure (18 : 0)
(5) Ölsäure (18 : 1 n-9)
(6) Linolsäure (18 : 2 n-6)
(7) ∝-Linolensäure (18 : 3 n-3)

Inj. = Zeitpunkt der Einspritzung

Die Identifizierung der einzelnen Peaks aus den Gaschromatogrammen der NL, GL und PL erfolgte über GC/MS (Analysendaten C.1.3.3.). Zur weiteren Absicherung wurden die Retentionszeiten der identifizierten Fettsäuren aus den Proben mit denen der entsprechenden Referenzsubstanzen verglichen. Hierbei ergab sich, daß die Hexadecensäure (16 : 1) in der Phospholipidfraktion nicht die von BENZ (1979) für Phospholipide beschriebene Palmitoleinsäure (16 : 1 n-7) darstellt: Nach der Zuspritzmethode trat in den PL-Proben die Referenzsubstanz Palmitoleinsäure neben der identifizierten Hexadecensäure als zusätzlicher Peak auf. Sicherlich handelt es sich um die trans-3-Hexadecensäure, die in hohen Mengen in PG und CL eingebaut wird (HARWOOD, 1980). Das Vorkommen von PG und CL in Oenotheren wurde ja auch über Dünnschichtchromatographie (vgl. Dünnschichtchromatogramm der PL, Abb. 22) nachgewiesen.

In den folgenden Abb. 27 und 28 sind die Massenspektren der α-Linolensäure (18 : 3 n-3) und der Hexadecensäure (16 : 1) dargestellt. Auf die Abbildung aller weiteren identifizierten Fettsäuren wurde an dieser Stelle verzichtet, da diese schon bei den Massenspektren der Fettsäuren aus Samenölen vorgestellt worden sind (vgl. Massenspektren von 16 : 0, 18 : 0, 18 : 1 n-9, 18 : 2 n-6, S. 33 - S. 37).

Auf die Erläuterung der Massenspektren der Kohlenwasserstoffe (Peak 1 - 7 im Gaschromatogramm der NL) wird nicht näher eingegangen, da diese für die Analytik der FAME aus NL der Blattlipide ohne Bedeutung sind.

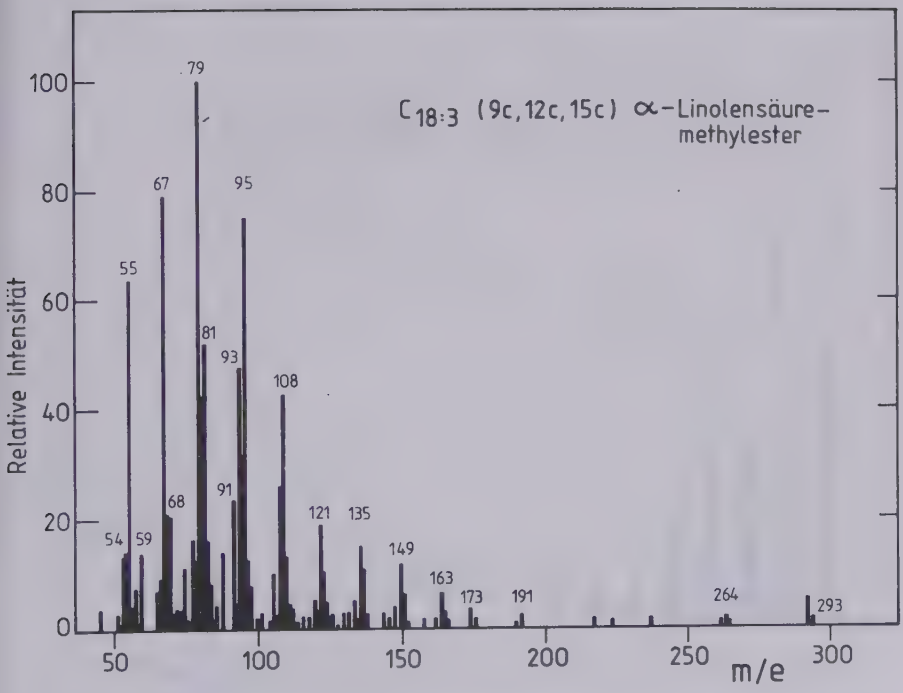


Abb. 27. Massenspektrum des Methylesters der ∝-Linolensäure (18 : 3 n-3).
m/e = Ionenmasse/Ionenenergie
Molekülionenpeak bei m/e 292

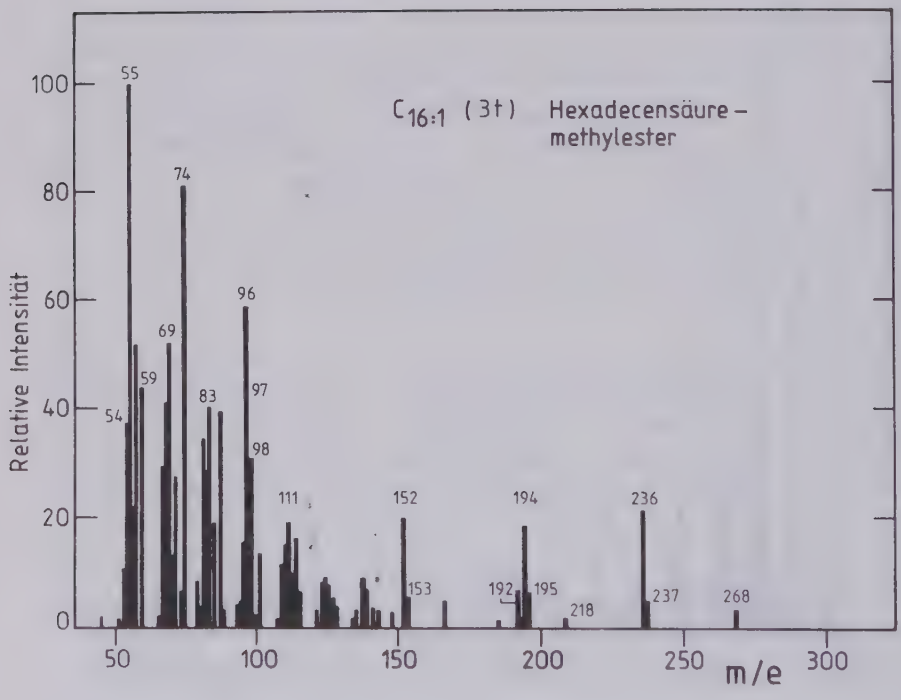


Abb. 28. Massenspektrum der Hexadecensäure (16 : 1, wahrscheinlich n-11).
m/e = Ionenmasse/Ionenenergie
Molekülionenpeak bei m/e 268

D.2.4. Quantitative Analyse der Fettsäuren von NL, GL und PL

Für die quantitative Bestimmung der FAME aus Blattlipiden wurden die Responsefaktoren der Komponenten nach C.1.3.3. in Relation zu 17 : 0 gaschromatographisch bestimmt. In Tabelle 20 sind die RRF-Werte der verschiedenen FAME aufgeführt.

Tabelle 20. RRF-Werte der FAME in Bezug auf Heptadecansäuremethylester (17 : 0). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 12 unabhängigen Eichstandardmischungen errechnet. Für 16 : 1 wurden die Werte der Palmitoleinsäure (16 : 1 n-9) eingesetzt.

FAME	RRF-Wert
Palmitinsäure (16 : 0)	1,17 ± 0,008
Hexadecensäure (16 : 1)	1,12 ± 0,009
Stearinsäure (18 : 0)	1,17 ± 0,012
Ölsäure (18 : 1 n-9)	1,16 ± 0,011
Linolsäure (18 : 2 n-6)	1,00 ± 0,010
α-Linolensäure (18 : 3 n-3)	0,84 ± 0,008

D.2.5. Die Lipidzusammensetzung der Blattlipide von Oenotheren

Für eine übersichtliche Charakterisierung der Blattlipide wurden die Oenotherenformen zunächst auf ihre Neutrale Lipid-, Glyko- und Phospholipidzusammensetzung hin untersucht, bevor dann eine genauere Analyse der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipidklassen durchgeführt wurde. In Tab. 21 ist der Lipidgehalt der individuellen Lipidfraktionen aufgelistet.

Tabelle 21. Lipidgehalt (mg Gesamtfettsäuren/g TG) in den individuellen Lipidfraktionen der Blattlipide von Oenotheren. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf je sechs Lipidfraktionierungen.

Genom-komplexe	Plasmon	mg FAME/g TG		
		NL	GL	PL
B · I	bert.	0,81 ± 0,01	20,44 ± 0,34	8,74 ± 0,26
B · I	od.	0,66 ± 0,01	15,34 ± 0,57	8,56 ± 0,23
l · v	bert.	0,45 ± 0,01	15,46 ± 0,30	6,53 ± 0,17
l · v	od.	0,26 ± 0,02	12,85 ± 0,54	4,94 ± 0,14

Schon bei diesem ersten Gesamtüberblick ist deutlich zu erkennen, daß bei den beiden Hybridpaaren mit den Genomkomplexen B · I und l · v jeweils die Bastardform mit berteriana-Plasmon signifikant höhere Mengen an Neutralen Lipiden und Glykolipiden aufweist. Bei den Phospholipiden gilt dies nur für die beiden l · v-Formen, die PL-Mengen der B · I-Formen hingegen differieren bei beiden Plasmonkombinationen nur sehr wenig.

Neben dem erwähnten Plasmoneinfluß auf den Gehalt an NL, GL und PL ist auch deutlich eine Steuerung der Kerngenome für die Gesamtlipide zur erkennen: Bei einem Vergleich der Lipidmengen aus Blättern von B · I- und l · v-Hybriden mit den entsprechenden Plasmonen sind generell in den B · I-Hybriden deutlich höhere Lipidquantitäten als in den l · v-Hybriden zu finden; dies trifft für alle drei Lipidklassen zu.

Die prozentuale Zusammensetzung der Blattlipide (Tab. 22) von Oenotheren harmoniert mit den in der Literatur für Blattlipide anderer Pflanzen angegebenen Werten (vgl. HARWOOD, 1980).

Tabelle 22. Prozentuale Zusammensetzung der Blattlipide von Oenotheren

		Lipidfraktionen in % des Gesamtlipidgehaltes		
Genomkomplexe	Plasmon	NL	GL	PL
B · I	bert.	2,70	68,15	29,14
B · I	od.	2,68	62,45	34,85
1 · v	bert.	2,00	68,89	29,09
1 · v	od.	1,44	71,19	27,36

Die Glykolipidfraktion spiegelt einen Großteil des Fettsäuregehalts der Chloroplastenmembranen wider. Bei Oenotheren beträgt der Anteil an GL je nach Hybride zwischen 62 % und 71 % (Tab. 22).

Die Phospholipidfraktion setzt sich hauptsächlich aus Fettsäuren mitochondrialer Membranen, aber auch von Chloroplastenmembranen und Membranen anderer Zellorganellen zusammen (vgl. MUDD, 1980). In den Blattlipiden der untersuchten Oenotherenformen nehmen die Phospholipide 27 % - 34 % des Gesamtlipidgehaltes ein.

Die Neutrale Lipid-Fraktion enthält hauptsächlich Triglyceride (vgl. D.2.2.1.). Der minimale Anteil der NL von 1,4 % - 2,7 % an Blattlipiden zeigt deutlich, daß die Oenotherenblätter nur sehr wenig Fette speichern.

D.2.6. Die Fettsäurezusammensetzung der NL, GL und PL in Oenotherenhybriden

Im folgenden werden die Neutralen Lipide, Glyko- und Phospholipide aus Blattlipiden von Oenotheren auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin analysiert. Hierbei läßt sich auch klären, ob die quantitativen Unterschiede im Lipidgehalt der NL, GL und PL (vgl. Tab. 22), die vom Plasmon der Hybridformen beeinflußt werden, auf einer unterschiedlich quantitativen und/oder qualitativen Fettsäureverteilung innerhalb der Fraktionen beruhen.

D.2.6.1. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der NL

In Tab. 23 und Tab. 24 ist die Fettsäurezusammensetzung der Neutralen Lipide der Oenotherenhybriden B · I und l · v mit berteriana- bzw. odorata-Plasmon aufgelistet.

Tabelle 23. Die Fettsäurezusammensetzung der NL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen B und I. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren
Pl. = Plasmon

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus NL	
FAME	B · I-bert.-Pl.	B · I-od.-Pl.
16 : 0	39,35 ± 5,00	35,35 ± 1,29
18 : 0	5,45 ± 0,98	4,33 ± 0,33
18 : 1 n-9	7,31 ± 0,44	9,29 ± 1,33
18 : 2 n-6	18,00 ± 2,27	24,47 ± 0,62
18 : 3 n-3	29,88 ± 3,31	26,40 ± 0,96
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,81	0,66

Tabelle 24. Die Fettsäurezusammensetzung der NL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen l und v. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
+ = nur in Spuren (< 0,5 %) vorhanden, für quantitative Vergleiche ungeeignet
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren
Pl. = Plasmon

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus NL	
FAME	l · v-bert.-Pl.	l · v-od.-Pl.
16 : 0	33,34 ± 0,39	40,28 ± 1,14
18 : 0	4,89 ± 0,59	+
18 : 1 n-9	5,64 ± 0,23	+
18 : 2 n-6	13,66 ± 0,30	20,76 ± 1,76
18 : 3 n-3	42,48 ± 0,92	38,96 ± 2,59
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,62	0,67

Die B · I-Hybriden mit berteriana- bzw. odorata-Plasmon weisen eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung ihrer NL auf. Die NL der Form B · I mit odorata-Plasmon enthalten mehr ungesättigte Fettsäuren (Verhältnis ges. : unges. FA 0,66) als die entsprechende Form mit berteriana-Plasmon (0,81). Als Hauptkomponente der NL ist bei beiden Hybriden die Palmitinsäure (16 : 0) zu nennen, gefolgt von den ungesättigten C_{18}-Fettsäuren α-Linolen-, Linol- und Ölsäure. Die gesättigte Stearinsäure bildet den geringsten Anteil der NL mit 4,3 % bzw. 5,45 %.

Bei den l · v-Hybriden mit berteriana- oder odorata-Plasmon hingegen enthalten die NL der Form mit berteriana-Plasmon höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren (0,62 im Gegensatz zur Form mit odorata-Plasmon 0,67). Der Plasmoneinfluß auf

den Desaturierungsgrad der Fettsäuren zeigt sich auch in der Tatsache, daß bei der Form l · v mit berteriana-Plasmon nicht wie bei den drei anderen untersuchten Hybriden die Palmitinsäure die Hauptkomponente der NL darstellt, sondern die α-Linolensäure den Hauptanteil der NL einnimmt.

Generell ist bei dem Hybridpaar mit den Genomkomplexen l und v der Anteil an α-Linolensäure um ca. 25 % höher als bei den beiden B · I-Formen; hier manifestiert sich eindeutig der Einfluß des Genoms auf die Fettsäurezusammensetzung der NL. Auch der unterschiedliche Gesamtgehalt der NL (vgl. Tab. 23 und Tab. 24) zwischen den beiden Hybridpaaren wird vom Kerngenom beeinflußt, wobei die Formen mit den Genomkomplexen B und I höhere NL-Mengen (> 25 %) in den Blattlipiden produzieren im Vergleich zu den l · v-Hybriden.

D.2.6.2. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der GL

Die Fettsäurezusammensetzung der GL aus Blattlipiden von Oenotheren veranschaulichen Tab. 25 und Tab. 26. Die Glykolipide sind ausschließlich Bestandteile der Chloroplastenmembranen, so daß ganz spezifisch die prozentuale Verteilung der Fettsäuren in berteriana- und odorata-Chloroplasten der beiden Hybridpaare untersucht werden kann.

Mit einem Anteil von 85 % - 87 % (Tab. 25 und Tab. 26) stellt die α-Linolensäure die Hauptkomponente der Chloroplastenfettsäuren dar. Neben ihr wird seltener noch Palmitinsäure (16 : 0) zu ca. 9 % in die Glykosyldiglyceride eingebaut; die C_{18}-Fettsäuren Linol-, Öl- und Stearinsäure verteilen sich auf auf den verbleibenden Anteil von ca. 5 %. Die beiden Hybridpaare B · I und l · v mit berteriana- oder odorata-Chloroplasten weisen eine relativ homogene Fettsäurezusammensetzung ihrer Chloroplastenmembranen auf, so daß im Gegensatz zu den N das Plasmon für die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren in Glykolipiden nur eine geringe Rolle spielt. Der Plasmoneinfluß beschränkt sich hauptsächlich wie auch bei den Samenölen auf den Gehalt an Glykolipiden, wobei im Vergleich der beiden Hybridpaare jeweils die Form mit berteriana-Plasmon bzw. -Chloroplasten höhere Glykolipidmengen aufweist (vgl. Tab. 21, S. 78).

Tabelle 25. Die Fettsäurezusammensetzung der GL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen B und I. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich jeweils auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus GL	
FAME	B · I-bert.-Pl.	B · I-od.-Pl.
16 : 0	9,01 ± 0,45	8,24 ± 0,26
18 : 0	1,12 ± 0,20	0,76 ± 0,03
18 : 1 n-9	0,58 ± 0,05	0,94 ± 0,05
18 : 2 n-6	3,59 ± 0,36	5,13 ± 0,05
18 : 3 n-3	84,96 ± 1,59	84,94 ± 0,30
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,11	0,09

Tabelle 26. Die Fettsäurezusammensetzung der GL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen l und v. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich jeweils auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus GL	
FAME	l · v-bert.-Pl.	l · v-od.-Pl.
16 : 0	9,28 ± 1,04	9,48 ± 0,83
18 :0	1,32 ± 0,26	1,18 ± 0,07
18 : 1 n-9	0,59 ± 0,14	0,45 ± 0,11
18 : 2 n-6	3,22 ± 0,16	2,96 ± 0,41
18 : 3 n-3	85,67 ± 1,08	87,62 ± 3,48
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,11	0,11

Ein gewisser Plasmoneinfluß muß auch für den Desaturierungsgrad der Fettsäuren in GL postuliert werden: Bei den B · I-Hybriden ist in den Glykosyldiglyceriden der Form mit odorata-Chloroplasten ein höherer Anteil an Linolsäure (18 : 2) eingebaut, was sich auf das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren auswirkt (0,09 gegenüber 0,11 bei der Form mit berteriana-Chloroplasten, Tab. 25). Das Bastardpaar mit den Genomkomplexen l und v hingegen zeigt diese Unterschiede in den Fettsäurerelationen nicht (Tab. 26).

Der höhere Gehalt an Glykolipiden bei den Hybridformen mit berteriana-Plasmon ist auf höhere Quantitäten der einzelnen Fettsäuren innerhalb der GL-Fraktionen zurückzuführen (Ausnahme: 18 : 1 n-9 und 18 : 2 n-6 bei den B · I-Hybriden). Dies veranschaulicht Abb. 29 (S. 85).

Bei den B · I-Hybriden sind zudem die Unterschiede in den gesättigten Fettsäuren bei berteriana- und odorata-Chloroplasten besonders hoch (vgl. Tab. 25). Bei den l · v-Formen weisen die Glykolipide der berteriana-Chloroplasten für jede Fettsäure signifikant höhere Quantitäten auf; dies wird auch durch die Ergebnisse von SCHWEDA (1985) aus Untersuchungen an Chloroplastenmembranen von Oenotheren bestätigt.

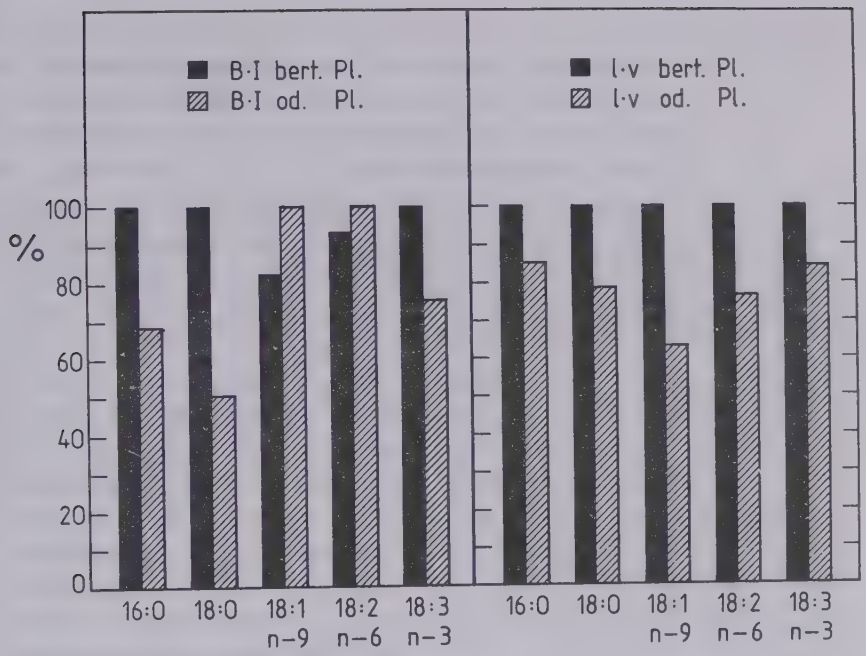


Abb. 29. Quantitativer Vergleich der Fettsäuremengen in Glykolipiden aus Chloroplastenmembranen von Oenotheren. (Der jeweils höhere Wert einer Fettsäure innerhalb eines Hybridpaares wurde = 100 % gesetzt). Die Standardabweichung liegt bei 1 - 5 % des jeweils angegebenen Mittelwertes (aus je sechs Analysen) und wurde graphisch nicht dargestellt.

D.2.6.3. Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der PL

Die Phospholipidfraktion der Blattlipide von Oenotheren setzt sich aus Fettsäuren unterschiedlicher Membranen zusammen (vgl. D.2.5.). Der Gehalt an Fettsäuren kann daher nicht wie bei den Glykolipiden für ein spezifisches Organell untersucht werden. Zur Vervollständigung der Ergebnisse und der qualitativen Charakterisierung der Phospholipide jedoch wurde auch hier eine Analyse der Fettsäurezusammensetzung der PL für die Hybridpaare B · I-und l · v-Kerngenom durchgeführt (Tab. 27 und Tab. 28).

Tabelle 27. Die Fettsäurezusammmensetzung der PL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen B und I. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich jeweils auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus PL	
FAME	B · I-bert.-Pl.	B · I-od.-Pl.
16 : 0	27,99 ± 0,63	27,13 ± 0,61
16:: 1	6,27 ± 0,22	5,66 ± 0,08
18 : 0	1,98 ± 0,04	1,61 ± 0,05
18 : 1 n-9	4,37 ± 0,18	5,14 ± 0,09
18 : 2 n-6	29,07 ± 0,80	29,04 ± 0,09
18 : 3 n-3	30,47 ± 0,74	31,44 ± 0,64
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,42	0,40

Tabelle 28. Die Fettsäurezusammensetzung der PL aus Blattlipiden von Oenotheren mit den Genomkomplexen 1 und v. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich jeweils auf sechs unabhängige Lipidfraktionierungen.
(un)ges. FA = (un)gesättigte Fettsäuren

	Anteil in % am Gesamtgehalt der FAME aus PL	
FAME	1 · v-bert.-Pl.	1 · v-od.-Pl.
16 : 0	27,72 ± 5,48	27,96 ± 0,32
16 : 1	5,48 ± 0,20	6,50 ± 0,22
18 : 0	2,70 ± 0,10	2,56 ± 0,16
18 : 1 n-9	2,73 ± 0,11	2,49 ± 0,09
18 : 2 n-6	28,53 ± 0,61	26,27 ± 0,49
18 : 3 n-3	32,86 ± 0,58	34,22 ± 0,61
$\frac{\text{ges. FA}}{\text{unges. FA}}$	0,43	0,44

Vergleicht man die Fettsäurezusammensetzung der PL mit der von GL und NL, so fällt auf, daß spezifisch für PL eine weitere Fettsäure in den Phosphatidyldiglyceriden auftritt: Es handelt sich hierbei um die für PG und CL typische trans-3-Hexadecensäure (D.2.3.). Neben dieser speziellen Fettsäure sind als Hauptkomponenten α-Linolensäure, Linol- und Palmitinsäure zu je ca. 30 % in den Phospholipiden zu finden; Stearinsäure wird wie schon bei NL und GL nur zu einem geringen Anteil (1,6 % - 2,7 %) in die Phosphatidyldiglyceride eingebaut.

Das Hybridpaar mit den beiden Komplexen B und I weist eine relativ homogene Fettsäurezusammensetzung seiner Phospholipide auf. Jedoch enthalten die PL bei der Form mit odorata-Plasmon einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren (Verhältnis ges. : unges. FA 0,40) gegenüber der Hybride mit berteriana-Plasmon. Diese Verhältnisse sind bei den l · v-Formen gerade umgekehrt. Somit kann der Einfluß des Plasmons wiederum wie bei den GL in Abhängigkeit vom Genom zu einer unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung führen. Neben diesen Genom-Plasmon-Interaktionen sind auch deutliche Genomeinflüsse bei der Fettsäurezusammensetzung der PL zu finden: In Hybriden mit den B · I-Genomkomplexen ist der Anteil an 18 : 1 fast doppelt so hoch wie bei den l · v-Formen (Tab. 27 und Tab. 28).

D.3. Diskussion

D.3.1. Zur Methodik

Zur Analytik der Blattlipide aus Oenotheren wurde eine für alle Lipidklassen quantitative und qualitative Analysenmethode entwickelt.

Die Auftrennung der Blattlipide in ihre drei Lipidfraktionen NL, GL und PL über Säulenchromatographie führte nach leichter Modifizierung der Lösungsmittelpolaritäten und -volumina zu einer quantitativen und reproduzierbaren Eluierung der Lipidklassen, eine Voraussetzung, die für vergleichende Paralleluntersuchungen an Oenotherenhybriden unabdingbar ist. Die quantitative Eluierung der einzelnen Komponenten konnte durch den Test auf Reinheit der Fraktionen leicht über Dünnschichtchromatographie belegt werden (D.1.6. und D.2.1., S. 59, S. 62).

Zur Gewinnung der Fettsäuren aus NL, GL und PL wurde die Transmethylierungsmethode nach BADINGS und DE JONG (1983) angewandt, die zunächst nur für die Methylierung der Fettsäuren aus Triglyceriden bestimmt war. Die Methode der direkten Transmethylierung der Fettsäuren mit Natriummethanolat, die sich für Samenöle bestens bewährt hat, erspart aufwendige Hydrolyseprozeduren und verkürzt die üblichen, z. T. auch giftigen FAME-Präparationen von mindestens einer Stunde auf zwei Minuten.

Für die Charakterisierung der NL, GL und PL über Dünnschichtchromatographie wurden Trennsysteme verwendet, die eine Analyse der Fettsäurezusammensetzung einzelner Komponenten sowohl in quantitativer wie auch in qualitativer Hinsicht erlauben.

Die gaschromatographische Auftrennung der FAME über die Kapillarsäule "Superox" erwies sich in bezug auf Trennleistung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als eine besonders geeignete Methode.

D.3.2. Der Einfluß des Kerngenoms und des Plasmons auf den Gehalt und die Fettsäurezusammensetzung der Neutralen Lipide, Glyko- und Phospholipide

Die Analyse der NL zeigte deutlich, daß bei den beiden Hybridpaaren mit den Genomkomplexen B · I und l · v jeweils die Bastardform mit berteriana-Plasmon höhere Mengen an NL produziert. Da die Fettsäuren der NL hauptsächlich aus Triglyceriden stammen, kann man davon ausgehen, daß die Formen mit berteriana-Plasmon mehr Fette speichern als die entsprechenden Hybriden mit odorata-Plasmon. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Samenölanalytik, wo ebenfalls alle Formen mit berteriana-Plasmon einen höheren Gehalt an Fettsäuren aufweisen. Untersucht man nun den Einfluß des Genoms auf die Synthese von Triglyceriden, so zeigt sich, daß die Hybridformen mit B · I-Genom fast die doppelte Menge an Fetten gegenüber den Formen mit l · v-Genom in ihren Blättern speichern. Bei den Samenölen hingegen produzieren die Formen mit l · v-Genom mehr Triglyceride. Dieser Widerspruch läßt sich jedoch auf die Gewebespezifität der Triglyceridsynthese zurückführen. Unterstützt wird diese Annahme auch dadurch, daß in Triglyceride der NL als dreifach ungesättigte Fettsäure nicht die für Oenotherensamenöle typische γ-Linolensäure, sondern die übliche α-Linolensäure (Tab. 23 und Tab. 24) eingebaut wird. Insgesamt ist die Fettspeicherung in Blättern mit einem Anteil an nur 1,5 - 2,7 % (Tab. 22) der Gesamtlipide sehr gering und für weitere Untersuchungen weniger interessant.

Die Glykolipide hingegen stellen mit einem Anteil von 62 % - 71 % (Tab. 22) die dominierende Fraktion in den Blattlipiden dar. Dies ist verständlich, da die GL die Hauptkomponente (zu ~ 80 %) der Chloroplastenlipide sind, und die Chloroplastenmembranen über 90 % der Membranoberfläche einer Zelle einnehmen (DOUCE und JOYARD, 1980).

Die GL treten spezifisch nur in Chloroplastenmembranen auf, so daß die Analysenergebnisse der Glykolipidfraktion für berteriana- und odorata-Chloroplasten vergleichend diskutiert werden können. Wie schon bei den NL zeigt sich auch

hier wiederum die eindeutige Tendenz, daß bei beiden Hybridpaaren jeweils die Form mit berteriana-Plasmon bzw. -Chloroplasten einen höheren Gehalt an GL aufweist (Tab. 22).

Wie bei vielen photosynthetisierenden Geweben bildet auch bei Oenotheren die α-Linolensäure mit 85 % - 87 % (Tab. 25 und Tab. 26) die Hauptkomponente der GL. Einen weiteren wichtigen Bestandteil in Glykosyldiglyceriden stellt die Palmitinsäure mit ca. 9 % dar. Die Oenotheren können somit dem photosynthetisierenden Typ der "18 : 3-Pflanzen" (hierzu gehören z. B. Phaseolus, Ricinus, Trifolium etc., DOUCE und JOYARD, 1980a) zugeordnet werden. Die für "16 : 3-Pflanzen" (zu ihnen gehören viele Vertreter der Solanaceae, Brassicaceae, Ranunculaceae und Chenopodiaceae, ALLEN et al., 1964; JAMIESON und REID, 1971) typische 16 : 3-Fettsäure tritt in Oenotheren-Glykolipiden nicht auf. Der Einbau der α-Linolensäure (18 : 3 n-3) als dreifach ungesättigte Fettsäure in GL weist zudem darauf hin, daß die Desaturierung der Linolsäure zur γ-Linolensäure (18 : 3 n-6) ausschließlich gewebespezifisch in den Oenotherensamen stattfindet. Man hätte durchaus das Auftreten von γ-Linolensäure in GL erwarten können, da einige Pflanzenfamilien (z. B. Boraginaceae oder Caryophyllaceae, JAMIESON und REID, 1969) in der Tat signifikante Mengen an γ-Linolensäure in ihre Glykosyldiglyceride einbauen.

Analog zu den Samenlipiden beschränkt sich der Einfluß des Plasmons hauptsächlich auf den Gehalt an Glykolipiden. Vergleicht man die Fettsäurezusammensetzung der GL innerhalb der untersuchten Hybridformen (Tab. 25 und Tab. 26), so ist vor allem in bezug auf die Hauptkomponenten 18 : 3 und 16 : 0 eine sehr ähnliche Zusammensetzung festzustellen.

Die Hybriden B · I mit berteriana-Plasmon sowie die Hybriden l · v mit berteriana- oder odorata-Plasmon weisen identische Relationen von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren auf (0,11). Die Hybride B · I mit odorata-Chloroplasten hingegen hat einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren (ges. FA : unges. FA 0,09), der insbesondere auf den höheren Gehalt an Linolsäure zurückzuführen ist. Hier zeigt sich

deutlich, daß für den Einbau der Fettsäuren in die Glykosyldiglyceride in Abhängigkeit vom Genom spezifische Genom-Plasmon-Interaktionen postuliert werden können.

Dies gilt auch für die individuellen quantitativen Unterschiede der einzelnen Fettsäuren von GL innerhalb der beiden Hybridpaare (vgl. Abb. 29). So zeigt sich bei den Hybriden mit den beiden Komplexen B und I, daß die Form mit berteriana-Chloroplasten wesentlich höhere Mengen an den gesättigten Fettsäuren 16 : 0 und 18 : 0 aufweist, während bei dem Hybridpaar l · v die höheren quantitativen Unterschiede eher bei den ungesättigten Fettsäuren 18 : 1 und 18 : 2 zu finden sind. Dieses spezifische Zusammenwirken von Kerngenom und Plasmon bei der Fettsäurezusammensetzung konnte ja auch schon für die Samenöle demonstriert werden.

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der Blattlipide von Oenotheren wurde auch eine Analyse der Phospholipidfraktion durchgeführt. Die Phospholipide sind wichtige Bestandteile zahlreicher Membranen (z. B. von Mitochondrien, Chloroplasten, microsomale Fraktion, Plasmalemma etc., MUDD, 1980) und stellen mit einem Anteil von 27 % - 34 % (Tab. 22) die zweitgrößte Fraktion der Oenotherenblattlipide dar.

Vergleicht man die Fettsäurezusammensetzung der PL (Tab. 27 und Tab. 28) mit der von NL (Tab. 23) und GL (Tab. 24), so fällt auf, daß spezifisch für Phospholipide eine weitere ungesättigte Fettsäure in den Phosphatidyldiglyceriden auftritt. Es handelt sich um eine Hexadecensäure (16 : 1) (D.2.3.). BENZ (1979) hatte diese Fettsäure als Palmitoleinsäure (16 : 1, 9c) in Phospholipiden von Mitochondrien beschrieben. Dieses Ergebnis muß jedoch korrigiert werden. Die gaschromatographischen Analysen demonstrieren deutlich, daß nach der Zuspritzmethode die Palmitoleinsäure in den Proben einen zusätzlichen Peak neben der über Massenspektrometrie identifizierten 16 : 1-Fettsäure ergab. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um die für PG und CL typische trans-3-Hexadecensäure (16 : 1, 3t). Weitere Methoden zur genauen Analyse der Doppelbindungsstelle der 16 : 1-

Fettsäure wie die Ozonolyse oder IR-Spektroskopie waren jedoch nicht Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

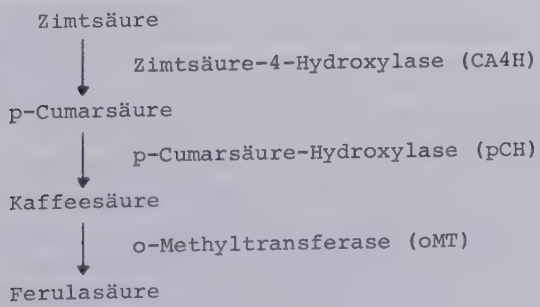
Wie bei den NL und GL sind auch bei den PL in den B · I-Formen höhere PL-Mengen gegenüber l · v-Hybriden zu finden (Tab. 22). Auch hier liegt wiederum eine Steuerung des Kerngenoms für die PL-Synthese vor.

Innerhalb des l · v-Bastardpaares zeigt die Form mit odorata-Plasmon wie auch bei NL und GL den geringeren Gehalt an Phospholipiden im Vergleich zur Hybride mit berteriana-Plasmon. Bei den B · I-Hybriden hingegen ist der Einfluß des berteriana-Plasmons auf die Synthese von Phospholipiden nicht festzustellen. Beide Bastardformen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Somit kann auch im Falle der Phospholipide eine vom Genom abhängige Genom-Plasmon-Interaktion für die Synthese der PL angenommen werden; in gleicher Weise lassen sich auch hiermit die Differenzen in der Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Hybridformen (Tab. 27 und Tab. 28) erklären.

E. Allgemeine Diskussion

Aus den Analysen der Zimt- und Phenolcarbonsäuren, der Samen- und der Blattlipide von Oenotheren geht hervor, daß das Plasmon die Synthese dieser Komponenten entscheidend beeinflußt. Bei allen Oenotherenformen mit identischem Kerngenom zeigte stets das berteriana-Plasmon eine stärkere Wirksamkeit bei der Interaktion mit den Genomen als das odorata-Plasmon. Über diese aus den jeweiligen Einzeldiskussionen gewonnenen Erkenntnisse hinausgehend sollen nun einige Überlegungen angestellt werden, an welcher Stelle der für die Synthese der genannten Substanzen verantwortlichen Enzymatik das Plasmon regulierend wirken könnte. Es sei hinzugefügt, daß neben der Möglichkeit, daß das Chondriom oder das Plastom solche Enzyme mitcodiert, über die Art der Regulation von Stoffwechselprozessen außerhalb der Organellen teilweise nur hypothetische Vorstellungen (HAGEMANN, 1980) bestehen.

1. HACHTEL (1972) konnte zeigen, daß das Plasmon bei der Regulation der Aktivität der PAL, die die Desaminierung von L-Phenylalanin zur trans-Zimtsäure katalysiert, eine wichtige Rolle spielt. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, daß auch die Akkumulationsrate der p-Cumarsäure, der Kaffee- und Ferulasäure Plasmon-abhängig ist. Biosynthetisch lassen sich diese Substanzen, ausgehend von der Zimtsäure, direkt voneinander ableiten:



Ob das Plasmon nun jede dieser Enzymaktivitäten beeinflußt oder ob die quantitativen Unterschiede der Zimtsäurederivate auf einem höheren Level der Zimtsäure, bedingt durch die plasmongesteuerte PAL-Aktivität, beruhen, kann erst durch enzymologische Untersuchungen geklärt werden.Die Enzymaktivitäten könnten z. B. durch Zugabe radioaktiv markierter Vorstufen (^{3}H-Phenylalanin und 3-^{14}C-Zimtsäure) analysiert werden (CZICHI und KINDL, 1977; BLUME und SAUNDERS, 1980).

Die Enzyme PAL, CA4H, pCH und OMT wurden in Assoziation an das Endoplasmatische Reticulum gefunden (CZICHI und KINDL, 1977; BILLETT und SMITH, 1980; CHARRIERE-LADREIX, 1979). Somit ist die Regulation der Akkumulationsrate von Zimtsäurederivaten ein Beispiel für die Wirkung des Plasmons (Plastom oder Chondriom ?) auf Stoffwechselprozesse im Kern-Cytoplasma-Raum.

Als Hauptkomponente der alkalisch hydrolysierbaren sekundären Pflanzenstoffe ist Gallussäure in den Blättern von Oenotheren zu finden. Diese stellt einen wichtigen Bestandteil der für Oenotheren typischen Galloylgerbstoffe dar (HADDOCK et al., 1982) und wird in Gerbstoffvakuolen abgelagert (HEGNAUER, 1964). Die Biosynthese der Gallussäure ist bis heute nicht geklärt, obwohl mittlerweile drei unterschiedliche Biosynthesewege für ihre Bildung vorgeschlagen wurden (HASLAM, 1982). Weiterführende Untersuchungen zur Regulation des Gallussäuremetabolismus sind daher noch nicht möglich.

2. Die Analysen der Samenlipide von Oenotheren zeigen, daß die extrachromosomale Konstitution deutlich die Syntheserate der Triglyceride beeinflußt. Mehr als 30 Enzyme sind an der Synthese der Triglyceride, beginnend beim Acetyl-CoA und endend im Triglycerid, beteiligt. Die Regulationsprozesse sind von extrem komplexer Natur und noch nicht geklärt (GURR, 1980). Da in erster Linie der Gehalt, aber nur in geringem Maße die Fettsäurezusammensetzung der Samenöle vom Plasmon modifiziert wird, kann man davon ausgehen, daß die Regulation des Plasmons an Enzymen einsetzt, die eine wichtige Schlüsselstellung in der Triglyceridsynthese einnehmen

bzw. die bei der Fettsäuresynthese eine limitierende Rolle spielen. Hierfür kommen vor allem das Fettsäure-Synthetase-system sowie die Acetyl-CoA-Carboxylase in Frage. Auf enzymologischer Basis könnte der Einfluß des Plasmons auf die Aktivität dieser Enzyme durch die Zugabe von 2-^{14}C-markiertem Acetat (SATO, 1985) und anschließender Radio-Gaschromatographie der gebildeten Fettsäuren überprüft werden. Untersuchungen an tierischen Zellen zeigten, daß der Gehalt an Triglyceriden von der Menge der Acetyl-CoA-Carboxylase bzw. der Fettsäuresynthetase und nicht von ihrer intrinsischen Aktivität abhängt (ALBERTS und GREENSPAN, 1984; NUMA und TANABE, 1984). Es wäre also durchaus denkbar, daß das Plasmon die Syntheserate dieser rate-limiting-Enzyme reguliert.

Ein besonders drastischer Einfluß des Plasmons ließ sich für die Produktion der γ-Linolensäure aufzeigen. Für den Desaturierungsschritt von Linolsäure zu γ-Linolensäure liegen spezifische Genom-Plasmon-Interaktionen vor, wobei in einem Ausnahmefall (bei den 1 · v-Hybriden) sogar das odorata-Plasmon die Synthese der γ-Linolensäure stärker förderte als das berteriana-Plasmon. Die Synthese der Fettsäuren bis zur Ölsäure findet in den Proplastiden statt, die weiteren Desaturierungsschritte laufen nach neueren Erkenntnissen (z. B. DOUCE und JOYARD, 1980) im Cytosol, wahrscheinlich im Endoplasmatischen Reticulum ab. Somit ist auch hier ein weiteres Beispiel gegeben, daß das Plasmon außerhalb der organelleigenen Synthese (hier außerhalb des Proplastids) auf Stoffwechselprozesse im Kern-Cytoplasma-Raum regulierende Wirkung besitzt.

3. Analog zu den Samenlipiden erwies sich auch der Gehalt an Blattlipiden als plasmonabhängig, während die Fettsäurezusammensetzung der Glyko- und Phospholipide wiederum in erster Linie vom Genom kontrolliert wird. Wie schon erwähnt, werden Glykolipide ausschließlich in Chloroplastenmembranen eingebaut, so daß die Analysen der Glykolipide speziell die Fettsäureverhältnisse in odorata- und berteriana-Chloroplasten widerspiegeln. Der höhere Gehalt an Glykolipiden in Blättern mit berteriana-Chloroplasten ist nun

nicht lediglich auf eine höhere Plastidendichte in den Blättern zurückzuführen. Untersuchungen an isolierten Chloroplasten zeigten ebenfalls einen höheren Glykolipidgehalt in berteriana-Chloroplasten (SCHWEDA, 1985). Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man somit schließen, daß berteriana-Chloroplasten mehr Glykolipide in ihre Membranen einbauen als odorata-Chloroplasten.

HACHTEL (1977) konnte nachweisen, daß sich odorata- und berteriana-Chloroplasten auch in ihrem Gehalt an Pigmenten und Membranproteinen unterschieden, wobei mindestens zwei dieser Proteine vom Plastiden-Genom codiert werden. Der unterschiedliche Glykolipidgehalt der odorata- und berteriana-Chloroplasten zeigt, daß auch bei diesem wichtigen Baustein der Chloroplastenmembranen das Zusammenwirken von Genom und Plasmon (in diesem Falle das Plastom) den charakteristischen Aufbau der Membranen bestimmt.

Untersuchungen an Plastidenribosom-freien Gerstenmutanten (DORNE et al., 1982a) ergaben, daß die Enzyme für die Synthese der Glykolipide höchstwahrscheinlich kerncodiert sind. Diese Mutanten haben aber den Nachteil, daß durch den Ausfall der Plastidenribosomen keine Thylakoidmembranen (diese sind ja plastidal codiert) gebildet werden, und somit keine Rückschlüsse über die Kontrolle des Genoms und Plastoms für den Aufbau und die Lipidzusammensetzung der Thylakoide erlauben. Für solche Untersuchungen sind die Oenotherenhybriden mit identischem Genom, aber unterschiedlichen Chloroplasten (und damit Plastom) ein wesentlich geeigneteres System. Weiterführende Lipidanalysen sollten daher für Chloroplastenenvelope und Thylakoide getrennt durchgeführt werden (s. z. B. CLINE et al., 1981; DOUCE und JOYARD, 1980b; DORNE et al. 1982b).

Analog zur Arbeit von BENZ (1979) an Mitochondrienmembranen könnte dabei gleichzeitig geklärt werden, ob die quantitative Verteilung der Glykolipideinzelkomponenten (MGDG, DGDG, Sulfo- und Phospholipide) sowie deren Fettsäurezusam-

mensetzung in den beiden Membrantypen der odorata- und berteriana-Chloroplasten vom Plastom gesteuert wird. Die analytischen Grundlagen hierfür wurden im Teil D der vorliegenden Dissertation schon ausgearbeitet.

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Kerngenoms und der extrachromosomalen Konstitution auf den Gehalt von Zimt- und Phenolcarbonsäuren, Samenölen und Blattlipiden von Oenotheren untersucht.

Als Hauptergebnisse sind hervorzuheben:

- Das Plasmon hat einen entscheidenden Einfluß auf die Akkumulationsrate alkalisch hydrolysierbarer Zimt- und Phenolcarbonsäuren. Sowohl bei den Hybriden mit den Genomkomplexen B und I als auch bei den l · v-Bastarden weisen die Formen mit berteriana-Plasmon z. T. mehr als die doppelte Menge an p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferula- und Gallussäure im Vergleich zu Hybriden mit odorata-Plasmon auf (Abb. 5, S. 21).
- Der gerichtete Einfluß des berteriana-Plasmons manifestiert sich in Kombination mit den B · I-Genomkomplexen stärker als in Kombination mit den l · v-Genomkomplexen (Tab. 5). Dies bedeutet, daß die Synthese der genannten sekundären Pflanzenstoffe über spezifische Kerngenom-Plasmon-Interaktionen reguliert wird.
- Die Samenölanalysen von vier verschiedenen Hybridpaaren demonstrieren, daß auch die Triglyceridsynthese in hohem Maße einer extrachromosomalen Kontrolle unterliegt. Die Samen der B · I-, v · I-, l · v- und B · v-Formen produzierten wiederum in Kombination mit berteriana-Plasmon mehr (10 - 25 %) Samenöle als in Kombination mit odorata-Plasmon.
- Die extrachromosomale Konstitution beeinflußt in erster Linie den Samenölgehalt (Tab. 10), die Fettsäurezusammensetzung hingegen wird hauptsächlich von den Genomkomplexen gesteuert (Tab. 14, S. 45). Dies ließ sich reproduzierbar für Samen aus Selbstungen verschiedener Jahrgänge aufzeigen.

- Der Einfluß der Chromosomenkomplexe auf die Triglyceridsyntheserate ist durch die Reihenfolge v - l/I - B gekennzeichnet (Abb. 16 und Abb. 17), wobei der v-Genomkomplex die Produktion von Samenölen am stärksten fördert, und der B-Genomkomplex die geringste Wirksamkeit besitzt; dies gilt für beide Plasmonkombinationen.
- Der Desaturierungsschritt von Linolsäure zu γ-Linolensäure über die Δ 6-Desaturase zeigt eine deutliche Plasmonabhängigkeit (Abb. 18 und Abb. 19). Diese pharmazeutisch wertvolle Fettsäure tritt in den einjährigen Oenotherenformen in wesentlich geringeren Konzentrationen als in den zweijährigen Nachtkerzen Oenothera biennis L. und Oenothera lamarckiana auf (Tab. 14 und Tab. 15). Die Verwendung der Samenöle von Oenothera berteriana und Oenothera odorata für therapeutische Zwecke ist daher weniger interessant.
- Die Charakterisierung der Blattlipide von B · I- und l · v-Hybriden ergab, daß sowohl der Gehalt von Neutralen Lipiden als auch der von Glyko- und Phospholipiden von spezifischen Kerngenom-Plasmon-Interaktionen abhängig ist (Tab. 21). Analog zu den Samenlipiden beschränkt sich der Einfluß des Plasmons hauptsächlich auf die Gesamtquantität der einzelnen Lipidkomponenten, die Fettsäurezusammensetzung hingegen wird wiederum von den Genomkomplexen kontrolliert (Tab. 23 bis Tab. 28). Die Regulation der Syntheserate von Samenölen und Blattlipiden über die extrachromosomale Konstitution erfolgt daher eher an Enzymen, die bei der Fettsäuresynthese eine limitierende Rolle spielen.
- Für die Untersuchung der Zimt- und Phenolcarbonsäuren, der Samenöle und Blattlipide wurde jeweils eine qualitativ und quantitativ reproduzierbare Gaschromatographie-Analysenmethode entwickelt.

G. Literaturverzeichnis

ALBERTS, A.W. und GREENSPAN, M.D. (1984): Fatty acid synthetase and its regulation. In: Fatty acid metabolism and its regulation. New Comprehensive Biochemistry, Vol.7 (NEUBERGER, A. und van DEENEN, L.L.M. gen. eds.), pp. 47-58, Elsevier, Amsterdam

ALLEN, C.F., GOOD, P., DAVIS, H.F. und FOWLER, S.D. (1964): Plant and chloroplast lipids. Separation and composition of major spinach lipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 424-430

ALT, J. (1980): Untersuchungen zur Konstanz des Plasmons und über die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Plastiden von genetisch bekannten Oenotheren. Dissertation, Tübingen

ALT, J., HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1982): Vererbung der Chloroplasten-DNA bei Munzia-Oenotheren. Berichte der dt. bot. Gesellschaft 95, 281-289

BADINGS, H.T. und DE JONG, C. (1983): Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of conditions for the quantitative analysis of short-chain and long-chain fatty acid in lipids. In: Proceedings of of the 5th Internat. Symp. Capillary Chromatogr. (RIJKS, G. ed.), pp. 543-557, Elsevier, Amsterdam

BARROW, K.D., COLLINS, J.G., ROGERS, P.L. und SMITH, G.M. (1983): Lipid composition of an ethanol-tolerant strain of Zymomonas mobilis. Biochim. Biophys. Acta 753, 324-330

BECKER, H. (1983): Das Öl der Nachtkerze Oenothera biennis, eine Quelle therapeutisch und dietätisch interessanter Fettsäuren. Z. f. Phytotherapie 2, 531-536

BENZ, R. (1979): Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipidzusammensetzung ihrer Membranen (Vergleichende Untersuchungen bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution). Dissertation, Tübingen

BILLET, E.E. und SMITH, H. (1978): Cinnamic acid 4-hydroxylase from gherkin tissues. Phytochem. 17, 1511-1516

BLUME, D.E. und SAUNDERS, J.A. (1980): High-pressure liquid chromatography for assaying several plant phenolic enzymes. Anal. Biochem. 114, 97-102

BRENNICKE, A. (1980): Untersuchung der mtDNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Dissertation, Tübingen

BRENNICKE, A. (1980): Mitochondrial DNA from Oenothera berteriana. Plant Physiol. 65, 1207-1210

BRENNICKE, A. und SCHWEMMLE, B. (1984): Inheritance of mitochondrial DNA from Oenothera berteriana and Oenothera odorata hybrids. Z. Naturforsch. 39c, 191-192

BURHENN, C. (1983): Über die Phenolcarbonsäuren einiger Oenotheren bekannter genetischer Konstitution (Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen). Staatsexamensarbeit, Universität Tübingen

CHARRIERE-LADREIX, Y. (1979): O-Methyl-transferases endoplasmiques de Populus nigra. Phytochem. 18, 43-45

CHERRY, J.H., BISHOP, L., HASEGAWA, P.M. und LEFFLER, H.R. (1985): Differences in the fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the U.S.A. Phytochem. 24(2), 237-241

CHRISTNER, J. (1973): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Flavonoidsynthese (Untersuchungen an Raimannia-Oenotheren). Dissertation, Tübingen

CLELAND, R.E. (1972): Oenothera. Academic Press, London

CLINE, K., ANDREWS, J., MERSEY, B., NEWCOMBE, H. und KEEGSTRA, K. (1981): Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 3595-3599

COLQUHOUN, I. und BUNDAY, S. (1981): A lack of essential fatty acids as a possible cause of hyperactivity in children. Med. Hypoth. 7, 673-679

CUNNANE, S.C., MANKU, M.S. und HORROBIN, D.F. (1985): Essential fatty acids in the liver and adipose tissue of genetically obese mice: effect of supplemental linoleic and γ-linolenic acids. Brit. J. Nutr. 53, 441-448

CZICHI, U. und KINDL, H. (1977): Phenylalanine Ammonia Lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledones: cooperation and subcellular distribution. Planta 134, 133-142

DIETRICH, W. (1977): The South American species of Oenothera sect. Oenothera (Raimannia, Renneria, Onagraceae). Ann. Mo. Bot. Gard. 64, 367-372

DORNE, A.-J., CARDE, J-.P., BÖRNER, T. und DOUCE, R. (1982a): Polar lipid composition of a plastid ribosome-deficient barley mutant. Pl. Physiol. 69, 1467-1470

DORNE, A.-J., BLOCK, M.A., JOYARD, J. und DOUCE, R. (1982b): Studies on the localization of enzymes involved in galactolipid metabolism in chloroplast envelope membranes. In: Biochemistry and metabolism of plant lipids (WINTERMANS, J.F.G.M. und KNIPER, P.J.C., eds.), pp. 153-164, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam

DOUCE, R. und JOYARD, J. (1980a): Plant galactolipids. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 4, Lipids: Structure and Function, pp. 321-357, Academic Press, New York

DOUCE, R. und JOYARD, J. (1980b): Chloroplast envelope lipids: Detection and biosynthesis. Meth. Enzymol. 69, 290-301

DOWNEY, R.K. und HARVEY, B.L. (1963): Methods of breeding for oil quality in rape. Can. J. Plant Sci. 43, 271-275

DOWNEY, R.K. (1964): Genetic control of fatty acid biosynthesis in rapeseed (Brassica napus L.). J. Am. Oil Chem. Soc. 41, 475-478

DRUCKER, D.B. und VEAZEY, F.J. (1977): Fatty acid fingerprints of Streptococcus mutans NCTC 10832 grown at various temperatures. Appl. Environm. Microbiol. 33(2), 221-226

FENTON, T.W., MUELLER, M.M. und CLANDININ, D.R. (1978): Isomerisation of some cinnamic acid derivatives. J. of Chromatogr. 152, 517-522

FOLCH, J., LEES, M. und SLOANE-STANLEY, G.H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226, 497

FREY, H.D. und SCHWEMMLE, B. (1967): Zur genetischen Analyse der circadianen Rhythmik bei höheren Pflanzen. Nachr. der Akad. der Wissenschaften, Göttingen 10, 106-107

GURR, M.I. (1980): The biosynthesis of triacylglyceroles. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 4. Lipids: Structure and Function (STUMPF, P.K. ed.), pp. 205 - 250, Academic Press, New York

HACHTEL, W. (1972): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Regulation der Aktivität der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (Untersuchungen an Raimannia-Oenotheren). Planta 102, 247-260

HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1972): Zur Beteiligung des Plasmons an der Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Z. f. Pflanzenphys. 68, 127-133

HACHTEL, W. (1977): Dependency of cp-membrane proteins on both nuclear and cp-DNA in some Oenothera species. Biochem. Physiol.der Pflanzen 171, 75-83

HADDOCK, E.A., GUPTA, R.K., AL-SHAFI, S.M.K., LAYDEN, K., HASLAM, E. und MAGNOLATO, D. (1982): The metabolism of gallic acid and hexahydrodiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. Phytochem. 21(5), 1049-1062

HAGEMANN, R. (1964): Plasmatische Vererbung. G. Fischer, Jena

HAGEMANN, R. (1980): Genetik und Molekularbiologie der Plastiden. II. Das Zusammenwirken von Plastiden-DNA und Kern-DNA. Biol. Rdsch. 18, 329-348

HARTLEY, R.D. und JONES, E.C. (1975): Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their cis and trans isomers by gas chromatography. J. of Chromatogr. 107, 213-218

HARWOOD, J.L. (1980): Plant acyl lipids. In: The Biochemistry of Plants. Vol. 4. Lipids: Structure and Function (STUMPF, P.K. ed.), pp. 2-48, Academic Press, New York

HASLAM, E. (1982): The metabolism of gallic acid and hexahydrodiphenic acid in higher plants. Fortschritte d. Chem. Org. Naturst. 41, 1-47

KNOWLES, P.F. (1968): Modification of quantity and quality of safflower oil through plant breeding. J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 130-132

KUNKEL, S.L., OGAWA, H., WARD, P.A. und ZURIES, R.B. (1981): Suppression of chronic inflammation by Evening Primrose Oil. In: Progress in lipid research (HORMAN, R.T. ed.), Vol. 20, Essential Fatty Acids and Prostaglandins, Pergamon Press, Oxford

LOTTI, G., IZZO, R. und LAND, M.G. (1978): Influenza del clima e delle concimazioni sull' olio di semi di Oenothera biennis L. Riv. Soc. It. Sci. Alim. 7, 361-368

MANKU, M.S. (1983): A comparison of GLC an HPLC methods for determining fatty acid composition of Evening Primrose and Soybean oil. J. Chromatogr. Sci. 21, 367-369

METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A. und PELKA, J.R. (1966): Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 38, 514-515

MICHAELIS, P. (1954): Cytoplasmatic inheritance in Epilobium and its theoretical significance. Advanc. Genet. 6, 287-401

MORITA, H. (1972): Identification of phenolic acids by gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. 71, 149- 153

MORRISON, W.R. und SMITH, L.M. (1964): Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boronfluoridemethanol. J. Lipid Res. 5, 600-608

MUDD, J:B: (1980): Phospholipid Biosynthesis. In: The Biochemistry of Plants. Vol. 4, Lipids: Structure and Function (STUMPF, P.K. ed.), pp. 250-280, Academic Press, New York

NEWBY, V.K., SABLON, R.-M., SYNGE, R.L.M., VANDE CASTEELE, K. und VAN SUMERE, C.F. (1980): Free and bound phenolic acids of lucerne (Medicago sativa cv europe). Phytochemistry 19, 651-657

NICHOLS, B.W. (1964): New Biochemical Separations. 15. Separation of plant phospholipids and glycolipids. pp. 321-327, Van Nostrand, Princeton, New York

NUMA, S. und TANABE, T. (1984): Acetyl CoA-carboxylase and its regulation. In: Fatty acid metabolism and its regulation. New Comprehensive Biochemistry, Vol. 7 (NEUBERGER, A. und van DEENEN, L.L.M. gen. ed.), pp. 9-23, Elsevier, Amsterdam

OSAGIE, A.U. und KATES, M. (1984): Lipid composition of millet (Pennisetum americanum) seeds. Lipids, Vol. 19(12), 958-965

OTTMAR, C. (1983): Untersuchungen zur Konstanz der Mitochondrien-DNA und über die mitochondrialen Proteine genetisch bekannter Oenotheren. Dissertation, Tübingen

PACCALIN, J., MENDY, F., BERNARD, M., DELHAYE, N. und SPIELMANN, D. (1983): Redécouverte d' une plante oléagineuse: l' Oenothera biennis. Interêt de l' acide gamma-linolénique en nutrition. Bull. Acad. Nat. Med. 167(8), 923-931

ROPER, R. und MA, T.S. (1957): Diazomethane as a reagent for microsynthesis. Microchem. J. 1, 245-260

ROUSER, G., KRITCHEVSKY, G. und YAMAMOTO, A. (1967): Lipid Chromatographic Analysis. Vol. 1, pp. 99-162, Dekker Inc., New York

SAFFORD, R., JEFFCOAT, R. und JAMES, A.T. (1975): Factors effecting the solubilisation of stearyl-CoA desaturase of hen liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta 409, 86-96

SATO, N. (1985): Lipid biosynthesis in epidermal, guard and mesophyll cell protoplasts from leaves of Vicia faba L. Plant Cell Physiol. 26(5), 805-811

SCHÖLKENS, B.A., GETWING, D., SCHLOTTE, V. und WEITHMANN, K. (1982): Evening Primrose oil, a dietary prostaglandin precursor, diminishes vascular reactivity to renin and angiotensin II in rats. Prostaglandin Leucotrienes and Medicine 8, 273-278

SCHULZ, J.M. und HERRMANN, K. (1980): Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. J. of Chromatogr. 195, 85-94 und 95-105.

SCHWEDA, S. (1985): Über die Lipidzusammensetzung eines reziproken Bastardpaares bekannter genetischer Konstitution. Staatsexamensarbeit, Universität Tübingen

SCHWEMMLE, J. (1938): Genetische und cytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren. III. Untersuchungen über das Zusammenwirken von Kern, Plasmon und Plastiden. Z. Vererb.-Lehre 75, 486-660

SCHWEMMLE, J., HAUSTEIN, E, STURM, A. und BINDER, M. (1938): Genetische und cytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren. Z. Vererb.-Lehre 75, 358-800

SCHWEMMLE, B. (1962): Über den Einfluß von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Raimannia-Oenotheren. Planta 58, 619-646

SHEPARD, A.J. und IVERSON, J.L. (1975): Esterification of fatty acids for gas liquid chromatographic analysis. J. Chromatogr. Sci. 13, 448-452

SIAKOTOS, A.N. und ROUSER, G. (1965): Analytical separation of nonlipid water soluble substances and gangliosides from other lipids by dextran gel column chromatography. J. Am. Oil Chemists Soc. 42, 913-917

SILVER, J.G., ROCHESTER, C.P., BISHOP, D.G. und HARRIS, H.C. (1984): Unsaturated fatty acid synthesis during the development of isolated Sunflower (Helianthus annuus L.) seeds. J. Exp. Bot. 35(159), 1507-1514

STUMPF, P.K. (1975): Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by maturing Carthamus tinctorius L. seeds. J. Am. Oil Chem. Soc. 52, 484-490

STUMPF, P.K. (1984): Fatty acid biosynthesis in higher plants. In: Fatty acid metabolism and its regulation. New Comprehensive Biochemistry, Vol. 7 (NEUBERGER, A., van DEENEN, L.L.M. gen. eds.), pp. 155-179, Elsevier, Amsterdam

SUMERE, VAN C.F., VANDE CASTEELE, K. und DE POOTER, H. (1976): Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occuring non-volatile phenolic compounds and related substances. J. of Chromatogr. 121, 49-63

VASKOVSKY, V.E. und KOSTETSKY, E.Y. (1968): Modified Spray for detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res. 9, 396-397

WRIGHT, S. und BURTON, J.L. (1982): Oral evening-primrose-seed-oil improves atopic eczema. The Lancet, 1120-1122

Lebenslauf

Name	:	Christine Monika Ilse Burhenn
Geburtstag, Geburtsort	:	26.12.1956 in Heising/Kempten
Eltern	:	Fritz Burhenn und Eva-Maria, geb. Tresp
Schulbesuch	:	1964-1967 Grundschule Heilbronn-Böckingen 1967-1976 Theodor-Heuss-Gymnasium Heilbronn
Reifeprüfung	:	18.05.1976
Studium:	:	WS 1976/77 Biologie und Theologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, SS 1977 - WS 1982/83 Biologie und Geographie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Prüfungen	:	1981 Staatsexamen in Geographie 1982 Staatsexamen in Biologie
Wiss. Arbeit	:	SS 1982 - WS 1982/83 am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. B. Schwemmle mit dem Thema: "Über die Phenolcarbonsäuren einiger Oenotheren bekannter genetischer Konstitution (Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen)".
Fortbildung	:	Grundkurs (Februar 1983) und Fortgeschrittenenkurs (März 1983) in der Gaschromatographie am Institut für Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. H. Pauschmann, Tübingen
Dissertation	:	Seit April 1983 am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. B. Schwemmle mit dem Thema:" Über den Einfluß der genetischen Konstitution auf den Gehalt von Zimt- und Phenolcarbonsäuren, Samenölen und Blattlipiden bei Oenotheren".
Tätigkeiten	:	Seit WS 1982/83 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie I, Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

Agerer, Ammermann, An der Heiden, Apfelbach, Barth, Berthold, Blume, Braun, Bunke, Dobat, Drumm, Engels, Frey, Fuldner, Ganzer, Grees, Grell, Gimmler, Haas, Hadeler, Hager, Hanack, Hannß, Horstmann, Jeschke, Karger, Koch, Kohlhepp, Kopp, Lange, Langgärtner, Loeschke, Mayer, Meyer, Mickoleit, Moser, Nakel, Neuenzeit, Neugebauer, Oberwinkler, Rähle, Rostock, Rundel, Sauer, Schanz, Schmidt-Koenig, Schneider, Schwarz, Schwemmle, Seiler, Seitz, Seyffert, Simonis, Strähle, Suhr, Vogel, Wagener, Werner, Westphal, Winkelmann, Wöhrmann.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 06151/21352